

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE FARMACOLOGICHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACOLOGICHE E BIOMOLECOLARI

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOTOSSICOLOGICHE, FARMACOGNOSTICHE E
BIOTECNOLOGIE FARMACOLOGICHE (XXV ciclo)

**SVILUPPO DI METODI ANALITICI PER IL CONTROLLO DI QUALITÀ
DI INTEGRATORI ALIMENTARI A BASE VEGETALE DESTINATI ALLA PERDITA DI
PESO E AL MIGLIORAMENTO DELLE PRESTAZIONI SPORTIVE**

Settore scientifico disciplinare: 03 D1 (ex CHIM 10)

DOTTORANDA: Dott.ssa Ariana Dos Santos

TUTOR: Chiar.ma Prof.ssa Patrizia Restani

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Chiar.mo Prof. Guido Franceschini

A.A. 2011/2012

SOMMARIO

1. FONDAMENTI TEORICI	5
1.1 INTEGRATORI ALIMENTARI.....	5
1.1.1 Integratori alimentari a base di piante	6
1.2 ASPETTO LEGISLATIVO.....	8
1.3 PROBLEMATICHE GENERALI DEGLI INTEGRATORI ALIMENTARI A BASE DI PIANTE... 	10
1.4 INTEGRATORI PER L'ATTIVITÀ SPORTIVA E LA PERDITA DI PESO	11
1.4.1 Principali cause dello sviluppo del mercato	11
1.4.2 Problemi in termini di sicurezza.....	12
1.5 DOPING	13
1.5.1 Diffusione storica del doping	15
1.5.2 Composti amminici.....	17
1.5.3 Composti di origine steroidea.....	20
1.6 PRINCIPALI PIANTE UTILIZZATE NEGLI INTEGRATORI PER LA PERDITA DI PESO E L'ATTIVITÀ SPORTIVA.....	26
1.6.1 <i>Citrus aurantium L.</i>	26
1.6.2 <i>Pausinystalia yohimbe</i>	28
1.6.3 <i>Ephedra sinica</i>	32
1.7 PROGETTO PLANTLIBRA	37
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	39
3. MATERIALI.....	41
3.1 STANDARD PURIFICATI.....	41
3.2 SOLVENTI	41
3.3 SALI, ACIDI E BASI.....	42
3.4 LASTRE PER TLC.....	42
3.5 REATTIVI PER LO SVILUPPO DELLE LASTRE TLC	42
3.6 CARTUCCE PER SOLID PHASE EXTRACTION (SPE).....	42
3.7 SOLUZIONI	42
3.8 STRUMENTAZIONE HPLC.....	43
3.9 STRUMENTAZIONE LC-MS.....	43
3.10 COLONNE E PRE-COLONNE PER LC	43
3.11 MATRICE UTILIZZATA COME BIANCO	44
3.12 CAMPIONI.....	44
4. METODI	45
A-Ricerca sistematica.....	45
B-Ricerca di ammine attive	46

4.1 TLC.....	46
4.1.1 Preparazione delle soluzioni standard	46
4.1.2 Preparazioni dei campioni.....	46
4.1.3 Modalità operative	46
4.1.4 Sensibilità dell'analisi con TLC	47
4.2 PROCEDURE DI VALIDAZIONE DEL METODO IN HPLC	47
4.2.1 Separazione ed idoneità del sistema HPLC	47
4.2.2 Limiti di Determinazione e Limiti di Quantificazione	47
4.2.3 Selettività	48
4.2.4 Accuratezza e Precisione	48
4.2.5 Recupero	49
4.2.6 Linearità.....	49
4.2.7 Stabilità degli analiti	50
4.3 HPLC.....	50
4.3.1 Preparazione delle soluzioni standard	50
4.3.2 Preparazione del campione	50
4.3.3 Modalità operative	52
4.4 LC-MS.....	53
4.4.1 Preparazione delle soluzioni standard	53
4.4.2 Preparazione del campione	53
4.4.3 Modalità operative	54
C-Ricerca di ormoni steroidei.....	55
4.5 TLC.....	55
4.5.1 Preparazione delle soluzioni standard	55
4.5.2 Preparazioni dei campioni.....	55
4.5.3 Modalità operative per TLC	55
4.5.4 Sensibilità dell'analisi con TLC	56
4.6 MESSA A PUNTO DEL METODO IN LC-MS E PROCEDURE DI VALIDAZIONE.....	56
4.6.1 Separazione ed idoneità del sistema HPLC.....	56
4.6.2 Limiti di Determinazione e Limiti di Quantificazione	56
4.6.3 Selettività	57
4.6.4 Accuratezza e Precisione	57
4.6.5 Recupero	58
4.6.6 Linearità.....	58
4.6.7 Stabilità degli analiti	58
4.7 LC-MS.....	59
4.7.1 Preparazione delle soluzioni standard	59
4.7.2 Preparazione degli standard interni (IS).....	59
4.7.3 Preparazione dei campioni	59
4.7.4 Modalità operative	60
5. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	62

A-Ricerca sistematica.....	62
5.1 EFFETTI AVVERSI DESCRITTI.....	62
5.2 EFFETTI AVVERSI DOVUTI A ERRORI DI IDENTIFICAZIONE.....	63
5.3 EFFETTI AVVERSI DOVUTI AD INTERAZIONI CON NUTRIENTI O FARMACI.....	63
5.4 BIOMARKERS.....	65
5.5 DISCUSSIONE.....	66
5.5.1 Effetti stimolanti.....	67
5.5.2 Interazioni con farmaci metabolizzati dal CYP3A4	67
5.5.3 Interazioni con farmaci antidepressivi	68
5.5.4 Interazioni con ormoni tiroidei.....	69
5.5.5 Interazioni con la caffeina	69
5.6 CONCLUSIONE DELLA RICERCA SISTEMATICA	70
B-Ricerca di ammine attive	71
5.7 TLC.....	71
5.7.1 Sensibilità	71
5.7.2 Dati analitici relativi ai campioni	72
5.8 MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DEL METODO HPLC.....	77
5.8.1 Valutazione dell'efficienza di estrazione.....	77
5.8.2 Separazione con HPLC e idoneità del sistema.....	78
5.8.3 Sensibilità	81
5.8.4 Selettività e Specificità	81
5.8.5 Accuratezza e Precisione	82
5.8.6 Recupero	83
5.8.7 Linearità.....	85
5.8.8 Stabilità	86
5.9 INDAGINE DEI CAMPIONI IN HPLC.....	87
5.10 INDAGINE SUI CAMPIONI IN LC-MS	88
5.11 RISULTATI GENERALI E DISCUSSIONE	91
C-Ricerca di ormoni steroidei.....	96
5.12 TLC	96
5.12.1 Sensibilità	96
5.12.2 Dati analitici relativi ai campioni	97
5.13 MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DEL METODO LC-MS.....	101
5.13.1 Scelta delle colonne per LC.....	101
5.13.2 Valutazione della procedura di estrazione.....	103
5.13.3 Separazione cromatografica con LC ed idoneità del sistema	107
5.13.4 Sensibilità	108
5.13.5 Selettività.....	109
5.13.6 Accuratezza e Precisione.....	109
5.13.7 Recupero.....	111
5.13.8 Linearità	111

5.13.9 Stabilità.....	113
4.13.10 Indagini dei campioni in LC/MS.....	115
4.13.11 Analisi degli standard.....	115
5.13.12 Analisi dei Campioni in LC-MS.....	121
5.14 RISULTATI GENERALI E DISCUSSIONE	122
BIBLIOGRAFIA.....	127

1. FONDAMENTI TEORICI

Per raggiungere nell'individuo uno stato di benessere fisico e psichico un ruolo importante è giocato dalla corretta alimentazione necessaria per coprire i fabbisogni di macro e micronutrienti e per ridurre i fattori di rischio di alcune patologie cronic-degenerative. D'altro canto, l'aumento della vita media della popolazione, i cattivi stili di vita e i modelli alimentari non ottimali sono alla base dell'insorgenza di patologie croniche. La ricerca scientifica è pertanto oggi incentrata sull'identificazione di componenti biologicamente attivi e potenzialmente in grado di favorire il benessere e operare nella riduzione dei fattori di rischio di determinate malattie. L'utilizzo di questi componenti ha di per sè notevoli vantaggi, quando i parametri di qualità e stabilità del prodotto che li contiene siano rispettati. Allo stesso tempo si pone in evidenza il problema della loro validità scientifica e della loro utilità, in relazione anche ad eventuali effetti collaterali.

1.1 INTEGRATORI ALIMENTARI

Un integratore alimentare è una preparazione che si può presentare in forma di tavolette, capsule, polvere o liquida ed è composto principalmente da nutrienti, micronutrienti ed altre sostanze commestibili con l'obiettivo principale di integrare e non sostituire, senza fini medici e senza specifici fini dietetici, una normale alimentazione, al fine di ridurre i fattori di rischio associati a patologie.

Si sono sviluppati diversi settori in grado di immettere sul mercato numerosi prodotti con il fine di raggiungere uno scopo salutistico. Gli interessi economici intorno al mercato dei prodotti salutistici (dei quali gli integratori fanno parte), hanno promosso una campagna pubblicitaria sempre più aggressiva nell'intento di presentare questi prodotti come indispensabili per il benessere quotidiano. L'incremento generale del tenore di vita e il contemporaneo aumento dei ritmi quotidiani della società attuale, hanno portato ad un'assidua ricerca dello "star bene", legando fortemente il benessere fisico a quello psicologico e quindi determinando un utilizzo sempre più frequente di questi prodotti.

Il mercato italiano degli integratori alimentari è in continua espansione. La libera vendita di questi prodotti in supermercati e parafarmacie ha influito sullo sviluppo rapido di questo settore, anche se le farmacie sono ancora il luogo preferito dai consumatori. I prodotti più venduti sono i multivitaminici, i multiminerali, i fermenti lattici e i prodotti a base di estratti

vegetali. I dati riportati in letteratura confermano che i prodotti contenenti ingredienti vegetali, quando somministrati in dosaggi, modalità e condizioni adeguate allo stile di vita del paziente e alle informazioni riportate in etichetta, possono contribuire positivamente al benessere generale dei soggetti [Evangelisti e Restani, 2011].

Per capire il mercato dalla parte del consumatore, l'AIIPA (Associazione Italiana Industrie Prodotti Alimentari), una delle principali associazioni in seno a Federalimentare e Confindustria, ha commissionato all'Istituto Astra Ricerche un'indagine per mettere a fuoco l'evoluzione degli stili alimentari degli italiani e in particolare il consumo degli integratori alimentari. L'85% della popolazione italiana, tra i 25 e 64 anni, conosce gli integratori, ma solo la metà di essi è consapevole che tali prodotti appartengono alla categoria degli alimenti e non a quella dei farmaci. I consumatori attuali di integratori alimentari sono, assai più della media, caratterizzati da stili di vita e alimentari più moderni, informati ed equilibrati: a differenza di quanto comunemente si immagina; è quindi il consumatore più evoluto e con lo stile alimentare più adeguato e sano quello che meglio conosce il ruolo e i benefici dell'integrazione alimentare. Nove milioni di adulti li hanno consumati nell'ultimo triennio: specie le donne, i giovani adulti, i soggetti con medi e alti titoli di studio, medio e alto reddito e possibilità di accesso a internet. Almeno 4 milioni e mezzo prevedono di diventare consumatori di integratori alimentari nel prossimo triennio, con una crescita del mercato tra il +35% e il 50%. In particolare, molti consumatori ritengono che l'utilizzo degli integratori può certamente essere utile se si ha un'alimentazione povera di alcuni sali minerali, vitamine, fibre; se si praticano sport e attività fisica di qualunque genere; in caso di esaurimento, astenia o convalescenza. Il quadro complessivo dell'intera popolazione italiana tra i 25 e i 64 anni è in sintesi il seguente: un settimo non sa affatto cosa siano gli integratori; il 37% non li ha mai consumati e ne dà una valutazione prevalentemente scettica per quanto attiene alla loro utilità; il 19% ne dà un giudizio ottimo e si prepara a consumarli nel prossimo futuro; il 29% è un consumatore largamente soddisfatto. Alla luce dei dati fin qui esposti, è sicuramente necessario rivedere l'efficacia e la correttezza delle conoscenze relative a tali prodotti. Proprio in questa direzione si concentrano da sempre gli sforzi di varie associazioni tra cui l'AIIPA [AIIPA, 2011].

1.1.1 Integratori alimentari a base di piante

L'abitudine ad assumere piante per integrare l'alimentazione e migliorare la risposta dell'organismo ad eventi stressanti a cui può essere soggetto, ha solide basi culturali e

scientifiche. Le piante sono normalmente utilizzate dall'uomo a scopo salutistico-terapeutico sin dall'epoca di Neanderthal (6000 anni fa) come dimostra il ritrovamento di frammenti di polline e fiori di varie specie in sepolture del nord dell'Iraq. A seguito di varie esperienze frutto del caso, l'uomo ha appreso come trarre vantaggi dall'utilizzo di alcune piante a scopo salutistico e terapeutico. Nei secoli l'uomo ha sperimentato un vasto numero di piante, spinto da comportamenti innati, insegnamenti ricevuti e per feedback evolutivisti che permettevano all'uomo di proteggersi da patogeni e sostanze esogene ambientali. Solo le tribù che consumavano una determinata pianta, ottenendo una maggior resistenza ad una malattia, potevano sopravvivere e trasmettere la conoscenza alle generazioni successive [Johns, 1990; Hart, 2005]. Tutte queste conoscenze acquisite nel tempo e in continua evoluzione vengono riportate nelle Farmacopee Tradizionali dei vari paesi. Queste documentazioni sono il risultato di millenni di osservazioni e prove che l'uomo ha raccolto per la ricerca di effetti benefici nell'utilizzo delle piante ma anche degli eventuali effetti tossici o avversi che possono produrre.

Un discorso approfondito e specifico riguarda i prodotti costituiti esclusivamente o in parte da ingredienti di origine vegetale che sono, allo stato attuale, inclusi tra gli integratori alimentari. Non essendo medicinali devono essere privi di qualunque finalità terapeutica e, quindi, per poter rientrare in questa categoria devono possedere solo finalità fisiologiche. I prodotti a base di piante sono costituiti da una miscela complessa di composti chimici presenti in natura, difficilmente caratterizzabili nella totalità ed in cui i componenti attivi del fitocomplesso possono non essere noti poiché, spesso, non tutte le sostanze attive presenti nelle piante sono state isolate e caratterizzate. Gli effetti attribuibili a tali prodotti possono essere dovuti all'azione di una o più molecole con varie attività fisiologiche o farmacologiche che dipendono fondamentalmente dalla dose. Il meccanismo d'azione dei principi attivi vegetali è ancora oggetto di ricerca, e molti di loro potrebbero agire in modo sinergico e, quindi, aumentare gli effetti benefici o quelli dannosi.

Questi prodotti sono solitamente considerati "prodotti naturali" e spesso vengono usati dalla popolazione a propria discrezione, in modo non controllato e senza consiglio. Molti integratori sono costituiti da piante con una lunga tradizione di utilizzo e per questo motivo non sono mai stati inclusi in studi clinici ai quali vengono sottoposti i medicinali. Un aspetto particolare riguarda la sicurezza di alcuni di questi prodotti per i quali è stato dimostrato un contenuto ingannevole, o comunque la non corrispondenza tra il contenuto indicato e quello reale. Questo significa che il consumatore potrebbe comprarli, o eventualmente importarli

se non reperibili nel mercato del proprio paese, senza alcuna difficoltà, ma anche senza ricevere alcuna garanzia sulla loro qualità. Tra i vari integratori alimentari vegetali, quelli a maggior rischio di abuso sono quelli che promuovono la perdita di peso, oppure che vengono utilizzati per aumentare le prestazioni fisiche.

1.2 ASPETTO LEGISLATIVO

Facendo riferimento alle due direttive principali europee, Direttiva 2002/46/EC e direttiva 2004/27/EC attuata in Italia con il D.L. 21 maggio 2004, n.169 è possibile stabilire la definizione di integratore alimentare e farmaco: “Si intende per integratori alimentari i prodotti alimentari destinati ad integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare ma non in via esclusiva aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale, sia monocomposti che pluricomposti, in forme predosate” [Minghetti e Marchetti, 2010]. La direttiva 2002/46/EC chiarisce che per effetto fisiologico si intende l’ottimizzazione di una funzione fisiologica e non il suo ripristino. Correzione o modificazione sono competenze invece dei farmaci. Attualmente la definizione di medicinale è disciplinata dall’articolo 1 del DLvo 219/06: “ ogni sostanza o associazione di sostanze presentata come avente proprietà curative o profilattiche delle malattie umane. È da considerare medicinale anche ogni sostanza o associazione di sostanze che può essere utilizzata sull’uomo o somministrata all’uomo allo scopo di ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche, esercitando un’azione farmacologica, immunologica o metabolica, ovvero di stabilire una diagnosi medica” [Minghetti e Marchetti, 2010].

Il quadro giuridico dell'Unione Europea intende che gli integratori alimentari ed i medicinali coesistono. Anche se essi sono presentati nella stessa forma e contengono lo stesso tipo di ingredienti, la differenza principale è l'utilizzo a cui sono destinati. Inoltre, la legislazione per gli integratori alimentari non è applicabile ai medicinali e viceversa. È specificamente indicato nella legge medicinale che qualora un prodotto rientri chiaramente nella definizione di altre categorie di prodotti, la direttiva non si applica [Direttiva 2004/27/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004].

Fino a poco tempo fa gli integratori alimentari erano soggetti a leggi diverse nei vari Stati Membri dell’Unione Europea. L’aumentato consumo di integratori alimentari, la necessità di una maggiore tutela del consumatore e il bisogno di creare un mercato comune Europeo per questi prodotti ha reso necessaria l’adozione di una specifica regolamentazione a livello

comunitario (Direttiva 2002/46/CE), aggiornata al DL.vo 139/2012 del 9 luglio. La Direttiva Europea ha avuto come obiettivo quello di creare una legislazione comune a tutti i paesi in modo da garantire ai consumatori l'acquisto di prodotti comparabili e favorire la libera circolazione delle merci: infatti, i produttori avranno un riferimento normativo comune e seguiranno le stesse norme [Di Giorgi et al., 2005]. Tuttavia, le norme nazionali possono ancora essere applicabili. Nella maggior parte degli Stati Membri, gli integratori alimentari sono soggetti ad una procedura di notifica prima di essere immessi sul mercato, mentre criteri come la composizione in relazione ai prodotti botanici non sono ancora stati armonizzati in tutti gli Stati Membri. Alcuni Stati Membri hanno norme specifiche ed elenchi positivi e/o negativi, mentre altri hanno solo le disposizioni generali. In alcuni Stati Membri, l'uso di erbe è generalmente ammesso, mentre in altri è fortemente limitato, in ogni caso, la mancanza di armonizzazione dell'uso di ingredienti botanici negli integratori alimentari non dovrebbe rappresentare un ostacolo alla libera circolazione delle merci. Il principio del reciproco riconoscimento del Parlamento Europeo applica uno dei principi fondamentali all'interno dell'UE: che tutti i prodotti legalmente fabbricati o commercializzati in uno Stato Membro possono essere venduti in qualsiasi altro Stato Membro. Gli stessi non sono autorizzati a vietare l'importazione di un prodotto, anche se non è conforme alle loro norme nazionali.

Gli integratori alimentari botanici sono soggetti a tutte le disposizioni della legislazione alimentare. Questo comprende innanzitutto il rispetto del regolamento generale della legislazione alimentare che specifica le responsabilità del produttore e impone un obbligo di notifica in caso di un problema di sicurezza con il prodotto [Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 28 Gennaio 2002]. La direttiva sugli integratori alimentari fornisce anche una clausola di salvaguardia in base al quale uno Stato membro può temporaneamente sospendere o limitare l'applicazione della direttiva quando si constati con motivazione circostanziata che un prodotto è pericoloso per la salute pubblica, in seguito a nuove informazioni o ad una nuova valutazione delle informazioni esistenti. La Commissione Europea segue poi una procedura per discutere e decidere le azioni da adottare in tutta l'UE.

Attualmente il Ministero della Salute fa riferimento a due elenchi di sostanze e preparati vegetali ammessi e non negli integratori alimentari. La lista non è esaustiva ed è in continua evoluzione. Nell'elenco delle sostanze e preparati ammessi sono riportati le sostanze e preparati vegetali ammessi negli integratori alimentari e le indicazioni di riferimento per gli

effetti fisiologici, come definite dalle linee guida ministeriali, che non costituiscono parte integrante dello stesso DM [Ministero della Salute, 2012]. Il secondo elenco contiene sostanze e preparati vegetali che presentano un profilo di attività non compatibile per effetti di tipo fisiologico [Ministero della Salute, 2009].

1.3 PROBLEMATICHE GENERALI DEGLI INTEGRATORI ALIMENTARI A BASE DI PIANTE

L'utilizzo di prodotti a base di piante è diventato molto diffuso a causa dell'idea comune ed errata che essi siano "naturali" e, quindi, privi di effetti avversi. L'ampia disponibilità sul mercato (anche grazie a internet) e il loro sempre maggiore utilizzo, sollevano preoccupazioni circa il contenuto, la purezza e la sicurezza di questi prodotti [Angell e Kassirer, 1998; Haller e Benowitz, 2000]. I problemi più comuni che riguardano la sicurezza di questi preparati comprendono:

- ✓ Uso improprio: poiché tali prodotti vengono ritenuti non dannosi dalla maggior parte della popolazione, raramente il consumo viene riferito al medico curante. Ma in realtà, l'utilizzo di questi integratori può aumentare non solo il rischio di interazioni con i farmaci, ma anche la probabilità di effetti collaterali indesiderati, principalmente nei casi dove il dosaggio giornaliero consigliato non è rispettato. Il fattore di rischio è legato al fatto che ritenendo questi prodotti sicuri, il dosaggio, la frequenza e la modalità di somministrazione sono considerati aspetti meno importanti rispetto a quanto previsto dagli schemi terapeutici previsti per i farmaci.
- ✓ Variabilità di contenuto in alcuni di questi dovuta alla mancanza di standardizzazione dei preparati vegetali: anche quando tali prodotti vengono utilizzati secondo le modalità più opportune, possono verificarsi reazioni indesiderate causate dalla bassa qualità del prodotto. La definizione della qualità dei prodotti vegetali presenta problemi soprattutto legati alla variabilità della pianta di origine influenzata da molti fattori quali le condizioni di coltivazione, raccolta e conservazione. Inoltre le piante sono soggette a variazioni naturali quali-quantitative a seconda della zona di raccolta e variazioni dovute anche a procedure di essiccazione e condizioni di immagazzinamento. Un ruolo importante è giocato anche dal metodo di estrazione impiegato e dai successivi metodi di lavorazione che possono provocare rilevanti

variazioni nella composizione, nella stabilità del preparato e influire sulle caratteristiche quali-quantitative del prodotto finale.

- ✓ Presenza di contaminanti o adulteranti: questo problema è legato principalmente all'uso di alcuni prodotti vegetali importati dall'estero che potrebbero essere sottoposti ad un limitato controllo di qualità. Ciò aumenta sensibilmente la possibilità di rischio per la salute dei consumatori a causa di contaminazioni accidentali, sofisticazioni intenzionali o la presenza di contaminanti di tipo microbiologico (muffe, lieviti e micotossine) o di natura chimica (pesticidi e metalli pesanti) [Fugh-Berman, 2000]. Possiamo citare inoltre, sofisticazioni fraudolente con principi attivi sintetici utilizzati nei farmaci della medesima classi che possono portare a gravi effetti collaterali [Ernst, 2002].
- ✓ Interazione con farmaci: alcuni prodotti vegetali interferiscono con alcuni farmaci, dando origine anche a interazioni potenzialmente pericolose. Tali prodotti possono presentare una specifica attività farmaco-tossicologica e interagire con farmaci di sintesi, potenziandone o riducendone gli effetti previsti. Numerose sono le segnalazioni riportate nella letteratura scientifica in tal senso. Un esempio è dato dalla interazione tra ammine (es. sinefrina contenuta nell'estratto di *Citrus aurantium*) e ormoni tiroidei [Williams et al., 1976; Sweetman, 2007; Rang et al., 2004; Firenzuoli et al., 2005]. L'interazione tra farmaci e piante medicinali costituisce un nuovo campo di studio della tossicologia clinica.

1.4 INTEGRATORI PER L'ATTIVITÀ SPORTIVA E LA PERDITA DI PESO

Questi prodotti vengono ampiamente consumati per le loro attività in programmi di controllo del peso e per migliorare le prestazioni fisiche durante l'attività sportiva.

1.4.1 Principali cause dello sviluppo del mercato

Sovrappeso e obesità sono spesso associati a co-morbidità, prematura mortalità, il diabete e malattie cardiovascolari. Per il sovrappeso e l'obesità esistono in commercio pochi farmaci e proprio per questo motivo e per le preoccupazioni in termine di sicurezza, sempre più pazienti rivolgono l'attenzione ad integratori alimentari a base di piante per favorire la perdita di peso. Anche gli integratori per l'attività sportiva, sia a livello agonistico che a livello

amatoriale, sono ampiamente utilizzati con un duplice scopo: da una parte reintegrare le sostanze perse durante l'attività sportiva e dall'altra per migliorare le prestazioni.

1.4.2 Problemi in termini di sicurezza

Uno dei problemi connessi con la sicurezza di questi integratori alimentari consiste nel fatto che alcuni possono mostrare non conformità tra quanto dichiarato in etichetta e il contenuto reale del prodotto.

Le analisi di 20 integratori alimentari contenenti efedrina hanno mostrato che la concentrazione di alcaloidi spesso differiva notevolmente dal contenuto dichiarato in etichetta [Gurley et al., 2000]. Cianchino et al. (2008) hanno analizzato quattro integratori dietetici a base di piante per il controllo del peso e hanno individuato sostanze non dichiarate come l'efedrina e la norefedrina e in tutti i casi le proprietà farmacologiche delle molecole non dichiarate corrispondevano con le indicazioni rivendicate dai prodotti. Nel 2010, Vaysse et al. hanno analizzato 20 campioni, tra erbe medicinali ed integratori alimentari, commercializzati come prodotti naturali dimagranti. Tra le formulazioni 14 erano adulterati: 13 contenevano sibutramina e l'ultimo conteneva sinefrina.

Per quanto riguarda gli steroidi, Geyer et al. (2004) hanno svolto uno studio basato sull'identificazione di ormoni steroidei (soprattutto testosterone e nandrolone) in integratori alimentari che non li dichiaravano. Sono stati analizzati 634 integratori alimentari provenienti da 13 paesi e da 215 fornitori differenti. Dei 634 campioni analizzati in 94 campioni sono stati rilevati ormoni androgenici non dichiarati in etichetta.

Oltre al rischio che questi prodotti possono comportare per la salute del consumatore, c'è il rischio per gli atleti professionisti di incorrere in risultati di positività nei test antidoping legato all'assunzione involontaria di principi attivi banditi dal regolamento con conseguenze anche molto serie. I principi attivi banditi sono elencati nella lista di riferimento, redatta dall'Agenzia Mondiale Anti-Doping [WADA, 2012], recepita in Italia sia dal Ministero della Salute che dal Comitato Olimpico Nazionale Italiano.

In **Tabella 1** vengono riportate alcune sostanze proibite dal Codice Mondiale Antidoping e che sono state ricercate nello studio disinvolto in questa tesi.

Tabella 1 - Sostanze proibite dal Codice Mondiale Antidoping incluse nello studio

Agenti Anabolizzanti	Nandrolone Testosterone enantato Stanozololo Deidroepiandrosterone Androstenedione Testosterone
Stimolanti	Efedrina Octopamina Norefedrina

È fondamentale informare gli atleti ma anche gli sportivi dilettanti che la presenza di un ingrediente di origine naturale può non garantire la totale sicurezza del prodotto. Inoltre, molte piante contengono principi attivi vietati o monitorati che dal punto di vista farmacologico sono ben conosciuti: alcuni esempi sono piante che contengono efedrina e alcaloidi correlati come l'*Ephedra sp.* Oppure nel *Citrus aurantium* è presente la sinefrina che è sottoposta alla stessa regolamentazione della caffeina (sottoposta a monitoraggio ma esclusa dalla lista delle sostanze antidoping). Altro aspetto importante è la presenza di differenze tra la legislazione Europea e Americana (dove il mercato di questi integratori è più permissivo). Prodotti importati da una paese possono contenere molecole non ammesse in un altro, infatti mentre in Stati Uniti d'America l'octopamina è consentita, in Europa è vietata.

1.5 DOPING

Il termine "doping" è stato utilizzato la prima volta nell'ambito delle corse ippiche in terra inglese per indicare il drogaggio dei cavalli da competizione al fine di alterarne le prestazioni ed influenzare l'andamento delle scommesse ad esso collegato [Vigorita, 1971]. L'origine di questo verbo è stato attribuito a diverse radici. Alcuni affermano che la parola derivi dal termine dop, una bevanda alcolica in uso presso alcune tribù Kafir dell'Africa sud-orientale utilizzata in alcuni riti di iniziazione e capace di indurre stati di alterazione delle percezioni mentali [Albanesi, 1971]. Altri attribuiscono l'origine al termine doop: tale termine veniva

usato dai coloni olandesi per indicare un liquore fortemente alcolico, capace di alterare lo stato psico-fisico dell'assuntore, entrato in uso durante la costruzione di Nuova Amsterdam (l'attuale New York), al fine di contrastare in qualche modo il clima e le situazioni ambientali del tutto inospitali [Canali, 2001; Aiello, 2004]. Alcuni considerano come origine del termine il sostantivo dope che indica un liquido utilizzato dai pionieri per indurire il cuoio delle scarpe rendendole più resistenti ai terreni impervi [Aiello, 2004].

Soltanto a metà dello scorso secolo le autorità governative e sportive presero in considerazione questo fenomeno, rilasciando una chiara definizione di sostanza dopante ed una lista in cui figurano le sostanze proibite per doping. A seconda della fonte esaminata, troviamo una differente definizione; una prima venne data nel 1962 dalla Federazione Medico Sportiva Italiana (FMSI) come "assunzione di sostanze dirette ad aumentare artificialmente le prestazioni in gara del concorrente, pregiudicandone la moralità, l'integrità fisica e psichica". Il Consiglio d'Europa, a sua volta, nel 1967 si esprime con un'altra definizione "è da considerarsi doping la somministrazione a un soggetto sano o l'utilizzazione, per qualsiasi mezzo, di sostanze estranee all'organismo o di sostanze fisiologiche in quantità o via anomala, al solo scopo di influenzare artificialmente ed in modo sleale la prestazione sportiva in occasione della partecipazione ad una competizione". La definizione più completa ed esaustiva in materia, arriva, però, con l'entrata in vigore del Codice Mondiale Antidoping redatto dalla WADA recepito poi dal regolamento antidoping del CONI (Comitato Olimpico Nazionale Italiano) e dalla stessa Convenzione di Strasburgo. Il doping viene definito come il verificarsi di una o più violazioni delle presenti Norme Sportive Antidoping (NSA) di cui ai successivi articoli 2 e 3 [WADA, 2012].

Le seguenti voci costituiscono violazioni delle NSA in quanto violazioni del Codice WADA:

- ✓ La presenza di una sostanza vietata o dei suoi metaboliti o marker nel campione biologico dell'Atleta;
- ✓ Uso o tentato uso di una sostanza vietata o di un metodo proibito da parte di un Atleta;
- ✓ Mancata presentazione o rifiuto, senza giustificato motivo, di sottoporsi al prelievo dei campioni biologici, previa notifica in conformità con la normativa antidoping applicabile, o comunque sottrarsi in altro modo al prelievo dei campioni biologici;
- ✓ Violazione delle condizioni previste per gli Atleti che devono sottoporsi ai controlli fuori competizione, incluse la mancata presentazione di informazioni utili sulla reperibilità e la mancata esecuzione di test che si basano sullo Standard

internazionale per i controlli. Ogni combinazione di tre controlli mancati e/o di mancata presentazione di informazioni entro un periodo di diciotto mesi, accertata dalle Organizzazioni antidoping aventi giurisdizione sull'Atleta, costituirà violazione delle NSA;

- ✓ Manomissione o tentata manomissione in relazione a qualsiasi fase dei controlli antidoping;
- ✓ Possesso di sostanze vietate e metodi proibiti;
- ✓ Traffico o tentato traffico di sostanze vietate o metodi proibiti;
- ✓ Somministrazione o tentata somministrazione ad un Atleta durante o alla fine delle competizioni, di un qualsiasi metodo proibito o sostanza vietata, fornire assistenza, incoraggiamento e aiuto, istigare, dissimulare o assicurare ogni altro tipo di complicità in riferimento a una qualsiasi violazione o tentata violazione delle NSA [WADA, 2012].

1.5.1 Diffusione storica del doping

Il fenomeno del doping ha origini antichissime, tanto quanto il desiderio umano del primeggiare di fronte ad ogni avversario ed ostacolo. Tantissime e diverse sono le testimonianze di tali pratiche nell'antichità: Galeno riporta che i Greci erano soliti usare stimolanti per migliorare le prestazioni sportive. Alle Olimpiadi, era pratica diffusa diete e alimentazioni particolari: il vincitore dei 200 metri ai giochi del 668 a.C. ammise di aver adottato una dieta ricca di fichi secchi. Gli Egiziani invece utilizzavano una sorta di decotto con gambi e petali di rosa per migliorare le prestazioni. Nel Colosseo ai tempi dei Romani i gladiatori assumevano radici ed erbe stimolanti per poter continuare a combattere anche dopo essere stati feriti. Ogni epoca presenta esempi in cui l'uomo ha assunto particolari prodotti al fine di migliorare le proprie prestazioni fisiche. Ai primi del novecento si presume che i nuotatori olandesi che gareggiavano nei canali di Amsterdam utilizzassero, come sportivi di altre discipline, sostanze stimolanti quali: caffeina, cocaina, stricnina, etere, alcol e ossigeno. L'uso diffuso di questi stimolanti sia singolarmente che in combinazione ha portato alla registrazione dei primi decessi. Il primo morto fu il ciclista Arthur Linton deceduto nel 1896 a seguito di assunzione di stricnina; nel 1904 ai Giochi Olimpici di St. Louis l'inglese Thomas Hicks collassò al termine della gara dopo aver assunto stricnina e alcol. Però fino agli anni '20, le notizie documentate dell'uso delle sostanze dopanti nello sport sono assai scarse e i test per individuare queste eventuali pratiche erano inesistenti [Santo Ferrara, 2004].

È con la seconda guerra mondiale e con lo sviluppo della ricerca chimico-farmacologica che il doping compie un notevole passo avanti. In particolare, la scoperta di nuove sostanze eccitanti, come le amfetamine, rappresenta un chiaro esempio di questo sviluppo. Tali sostanze venivano somministrate ai piloti di caccia tedeschi per incrementare la loro resistenza fisica alle lunghe ore di volo e per aumentare la loro aggressività in battaglia. Queste pratiche sono state applicate anche in conflitti più recenti come nella guerra contro l'Iraq. Gli anni '50 sono stati caratterizzati dall'uso nello sport di questi stimolanti, soprattutto in discipline (quali il ciclismo) che richiedono una particolare resistenza fisica. In questi anni ci furono alcune morti clamorose dovute all'abuso di queste sostanze. Nel 1960 alle Olimpiadi di Roma morì il ciclista olandese Kunt Jensen, sette anni dopo al Tour de France morì l'inglese Tom Simpson al quale furono trovate nelle tasche della maglietta pillole di amfetamina. Durante gli anni '50 compaiono negli USA i primi anabolizzanti che portarono ad un nuovo approccio del doping, mentre le amfetamine ed altri stimolanti venivano utilizzati il giorno della gara, gli anabolizzanti vengono utilizzati settimane e mesi prima della competizione. Queste sostanze permettevano di ottenere un incremento della forza, acceleravano il recupero fisico e permettevano di affrontare al meglio le competizioni sportive. Inizia così il doping di stato dove la vittoria sportiva diventa un elemento importante per testimoniare la validità di un modello politico sull'altro. Alla fine degli anni '80 gli anabolizzanti, insieme all'emodoping (caratterizzata dall'uso di eritropoietina ricombinata), si diffondono a macchia d'olio nel mondo sportivo [Santo Ferrara, 2004].

Gli ultimi 20 anni sono caratterizzati da una buona reazione da parte delle istituzioni sportive che hanno cominciato ad utilizzare sempre più efficaci strumenti nella lotta al doping. Significativa è una disposizione del Comitato Olimpico Internazionale (CIO) che, nelle olimpiadi del 2004 di Atene, ha stabilito la retroattività dei controlli antidoping, per colpire chi, sfuggito ad un primo esame, venga in seguito scoperto. Aspetto rilevante, poiché la tecnica dei controlli è spesso un passo indietro rispetto ai sistemi dopanti utilizzati dagli atleti e dai loro staff medici che, disponendo spesso di ingenti risorse economiche e tecniche, riescono sempre a mettere a punto nuove pratiche. È esattamente questa la sfida del ventunesimo secolo in questo campo, che ha come obiettivo la conoscenza, da parte degli organi di controllo, delle possibili nuove forme di doping che verranno utilizzate.

1.5.2 Composti amminici

Molto spesso negli integratori alimentari si trovano estratti di piante contenenti ammine ad attività simpaticomimetica. Gli agonisti beta adrenergici sono noti per la loro capacità di far aumentare la massa muscolare e contemporaneamente diminuire la massa grassa. Un trattamento prolungato con composti simpaticomimetici riduce l'apporto di energia e aumenta il dispendio di energia [Yang e McElligot, 1989] tramite la stimolazione che queste sostanze inducono sul sistema simpatico, mentre un'attività ridotta dei nervi simpatici è associata all'aumento del peso corporeo [Spraul et al., 1993]. Il sottotipo 3 dei recettori adrenergici beta sembra essere quello responsabile dell'effetto termogenico e lipolitico degli agenti adrenergici, mentre la loro interazione con gli altri sottotipi (alfa 1 e 2, beta 1 e 2) controllerebbe gli effetti cardiaci [Yang e McElligot, 1989; Spraul et al., 1993].

Tra le ammine, quelle più frequentemente addizionate o presenti negli integratori alimentari sono l'efedrina, la sinefrina, l'octopamina, la norefedrina e la yohimbina.

Efedrina

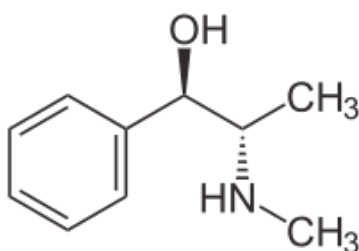


Figura 1- Formula chimica dell'efedrina

L'azione stimolante dell'efedrina (**Figura 1**) sul sistema adrenergico è il motivo per il quale è stata ampiamente usata per la produzione di integratori alimentari a funzione dimagrante [Astrup et al. 1992, 1993]. Inoltre, l'efedrina è risultata particolarmente efficace quando associata alla caffeina [Astrup et al., 1995] e questa sua efficacia è dovuta all'effetto sinergico delle due molecole, dato che entrambe sono noti stimolanti del sistema nervoso centrale. L'efedrina è tuttora utilizzata come decongestionante nasale ma la sicurezza dell'utilizzo per via orale di integratori alimentari per la perdita del peso è stata oggetto di molteplici critiche da parte del mondo medico. Sebbene alcuni studi clinici mostrino come un uso corretto dell'efedrina possa essere privo di effetti collaterali seri, esistono altri studi che hanno evidenziato il rischio dell'uso dell'efedrina nei prodotti anoressizzanti [Haller et al., 2000; Preuss et al., 2002]. La molecola ha un profilo di agonista misto, poiché è un

agonista diretto (stimolante) dei recettori adrenergici α e β ma anche un agonista indiretto, dato che induce un aumento del rilascio delle catecolammine e un'inibizione della loro ricaptazione. Inoltre, induce termogenesi poiché aumenta l'utilizzo di energia cellulare da parte delle cellule del tessuto adiposo e della muscolatura scheletrica [Chen e Schmidt, 1930].

La maggior parte degli effetti collaterali attribuiti all'efedrina riguardano il sistema cardiovascolare soprattutto quando viene somministrata in associazione alla caffeina; ipertensione, tachicardia, palpitazioni, aritmie, ma anche ansia, anoressia, nausea, vomito, tremori sono le sintomatologie più spesso registrate [Preuss et al., 2002].

***p*-sinefrina**

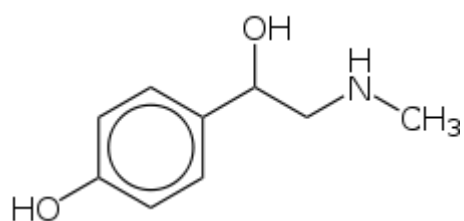


Figura 2- Formula chimica della *p*-sinefrina

La *p*-sinefrina (**Figura 2**) è il principale alcaloide presente nei frutti e negli estratti di *Citrus aurantium*. È strutturalmente simile all'efedrina e viene comunemente impiegata nei prodotti denominati "ephedra-free" (senza efedrina).

In Stohs et al. (2011) vengono riportati vari studi condotti su animali e studi clinici sull'uomo che analizzano l'attività della *p*-sinefrina (per distinguerla dalla *m*-sinefrina di origine sintetica) a seguito di interazione con i recettori alfa e beta adrenergici. Questi studi hanno dimostrato che la *p*-sinefrina ha una bassa affinità verso i recettori α e β ₁₋₂. Poiché l'attivazione di questi recettori comporta un incremento della vasocostrizione, contrazione cardiovascolare e aumento della velocità cardiaca, la *p*-sinefrina presenta una ridotta attività sul sistema cardiovascolare quando somministrata oralmente [Haller et al., 2005]. Un altro studio invece indica che la *p*-sinefrina potrebbe avere una certa affinità verso i recettori β ₃ ai quali è associato un effetto termogenico, incremento della lipolisi e del metabolismo del glucosio e colesterolo [Parmar e Kar, 2008].

Octopamina

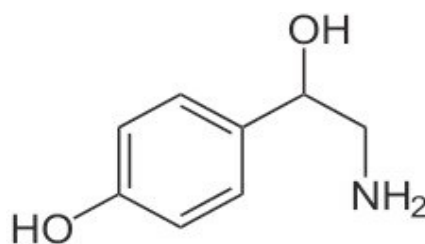


Figura 3- Formula chimica dell'octopamina

L'octopamina (**Figura 3**) è una monoammina biogenica strutturalmente correlata alla noradrenalina e venne scoperta da Vittorio Erspamer nel 1948 nella ghiandola salivare del polpo *Octopus vulgaris*. Agisce come un neurormone, neuromodulatore e un neurotrasmettitore in invertebrati. È presente in concentrazioni relativamente elevate nei neuroni nonché in tessuti non neuronali di molte specie di invertebrati [Roeder, 1999].

L'octopamina è un derivato metabolico della tiramina. Si forma, infatti, tramite β -idrossilazione della tiramina ad opera della dopamina β -idrossilasi. Insieme alla sinefrina è uno dei principali alcaloidi contenuti nel *C. aurantium*, tuttavia è presente in quantità molto minori rispetto alla sinefrina. L'octopamina sembra avere una certa selettività verso i recettori β_3 adrenergici [Carpene et al., 1999].

Norefedrina

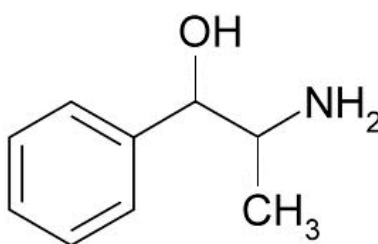


Figura 4- Formula chimica della norefedrina

La norefedrina (**Figura 4**) nota anche come fenilpropanolamina, è una molecola sintetica utilizzata in passato come decongestionante della mucosa nasale, finché diversi studi hanno dimostrato l'aumentato rischio di ictus dopo trattamento con tale sostanza [Yakoot, 2012].

Come conseguenza, le industrie farmaceutiche hanno deciso di ritirare volontariamente dal commercio tutti i prodotti a base di norefedrina.

Yohimbina

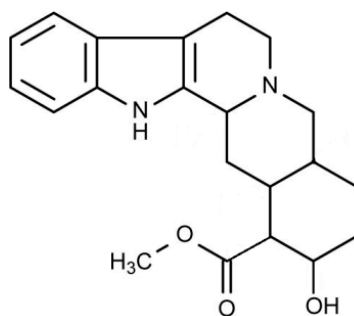


Figura 5- Formula chimica della yohimbina

La yohimbina (**Figura 5**) è un alcaloide estratto dalla *Pausinystalia yohimbe* [Chen et al., 2008] riconosciuto come antagonista presinaptico dei recettori α_2 [Murburg et al., 1991]. È considerata una “dirty drug” in quanto oltre ad agire sul sistema simpatico opera direttamente sul sistema serotoninergico centrale come agonista [Feuerstein et al., 1985].

1.5.3 Composti di origine steroidea

Tra le sostanze utilizzate per fini dopanti, particolare rilevanza hanno acquisito in campo sportivo gli agenti anabolizzanti. Questi ormoni vengono soprattutto utilizzati in discipline sportive quali: sollevamento pesi, bobybuilding, wrestling, football, lancio del peso e del disco. Gli anabolizzanti possono essere anche utilizzati in associazione a gonadotropine corioniche umane (HCG) che aumentano la sintesi di testosterone per contrastare l’atrofia testicolare e in associazione a diuretici al fine di ridurre la ritenzione di acqua e aumentare la diluizione delle urine per i drug test. Altre sostanze possono essere usate in associazione agli anabolizzanti, quali antiestrogeni per contrastare il fenomeno della ginecomastia e l’ormone adrenocorticotropo (ACTH) per aumentare la produzione di steroidi endogeni.

Molti di questi ormoni vengono assunti tal quali per via parenterale; tuttavia non è una pratica accessibile a tutti e molti atleti soprattutto dilettanti, tendono a evitarla assumendoli per via orale.

È noto che il doping può danneggiare la salute. Gli agenti anabolizzanti come lo stanozololo e il testosterone aumentano forza e resistenza, ma possono causare comportamenti aggressivi, impotenza, danni renali, aumento della pressione arteriosa, acne, livelli elevati di colesterolo e ginecomastia nei maschi e lo sviluppo di caratteristiche maschili e dei peli nel corpo delle femmine [O'Leary, 2001; Jickells e Negrusz, 2008].

Alcuni steroidi anabolizzanti comunemente utilizzati nello sport sono: testosterone, stanazololo, nandrolone, deidroepiandrosterone, androstenedione, metandrostenolone e testosterone enantato che rientrano nella lista delle sostanze vietate per doping.

Stanozololo

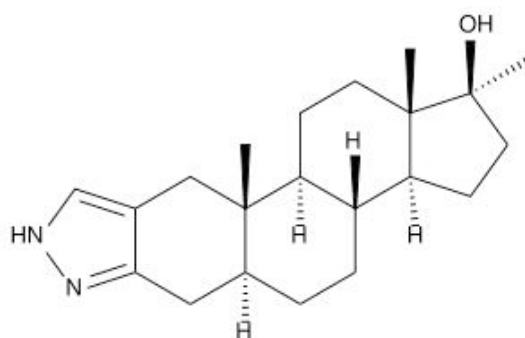


Figura 6- Formula chimica dello stanozololo

Lo stanozololo (**Figura 6**) è un derivato del testosterone che è stato utilizzato da molti atleti professionisti. Questo ormone promuove la crescita cellulare (anabolismo) e lo sviluppo/mantenimento delle caratteristiche maschili (androgenismo). È un ormone anabolico sintetico che viene utilizzato in terapia nel trattamento dell'angioedema ereditario in quanto innalza la produzione epatica della proteina C1-inibitore (responsabile nell'attivazione dei fattori della permeabilità vascolare) [Drug Bank - Stanozolol, 2012].

Testosterone

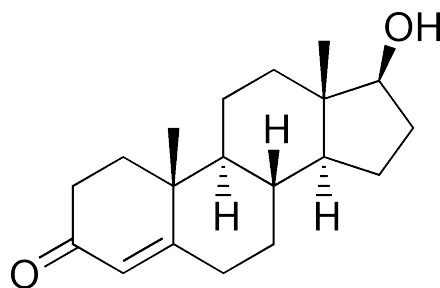


Figura 7- Formula chimica del testosterone

Il testosterone (**Figura 7**) è un ormone sia anabolizzante (contribuisce alla formazione dei tessuti) che androgeno (promuove lo sviluppo di “caratteristiche maschili” come la voce profonda e peli sul viso). Il testosterone è un ormone sessuale che si trova sia negli uomini che nelle donne. Negli uomini, il testosterone è prodotto dalle cellule di Leydig (interstiziali) a seguito di stimolazione dell’ormone luteinizzante (LH). La funzione del testosterone è quella di stimolare la spermatogenesi, promuovere la maturazione fisica e funzionale degli spermatozoi, mantenere gli organi accessori del tratto riproduttivo maschile e sostenere lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari maschili. Inoltre stimola la crescita e il metabolismo in tutto il corpo e lo sviluppo celebrale, influenzando il comportamento sessuale e il desiderio sessuale. Nelle donne il testosterone viene prodotto dalle ovaie (25%), ghiandole surrenali (25%) e tramite conversione periferica dell’androstenedione (50%). Il testosterone esercita un meccanismo di feedback negativo sul rilascio ipofisario di LH (ormone luteinizzante) e ormone follicolostimolante (FSH). Inoltre viene convertito in diidrotestosterone (forma attiva del testosterone) oppure in estradiolo in base al tessuto in cui avviene la conversione.

Il testosterone è utilizzato nella terapia ormonale sostitutiva negli uomini per il trattamento dell’ipogonadismo congenito o acquisito e climaterio maschile (andropausa). Nelle femmine viene utilizzato per il trattamento palliativo del carcinoma mammario avanzato e inoperabile. Oltre a trattamenti terapeutici il testosterone viene utilizzato anche in ambito sportivo per scopi dopanti con gravi effetti collaterali [Houlihan, 1999].

Testosterone enantato

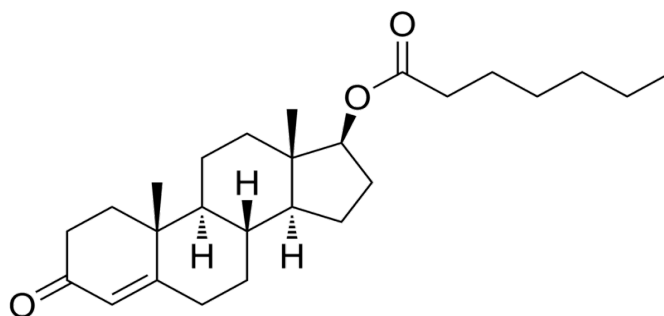


Figura 8 - Formula chimica del testosterone enantato

Il testosterone enantato (**Figura 8**) è la forma iniettabile del testosterone. Viene somministrata per via intramuscolare utilizzando come veicolo un solvente oleoso. La formulazione del testosterone enantato permette di ottenere una forma farmaceutica a lento rilascio che permette di somministrare il farmaco ogni 2 o 4 settimane [Drugbank - Testosterone enanthate, 2010].

Nandrolone

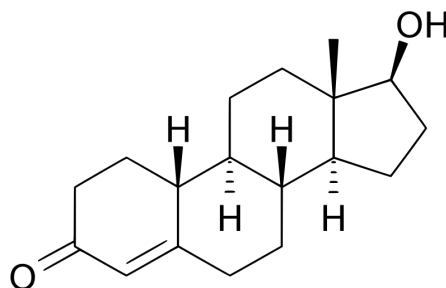


Figura 9- Formula chimica del nandrolone

Il nandrolone (**Figura 9**) è uno steroide con proprietà anaboliche e androgeniche normalmente presente nel corpo umano in piccole quantità. Il nandrolone aumenta la produzione e l'escrezione urinaria di eritropoietina. Tale ormone si lega al recettore degli androgeni in misura maggiore rispetto al testosterone ma, a causa della sua ridotta capacità di agire sui muscoli ha un minore effetto sulla crescita muscolare. Viene utilizzato per il trattamento delle anemie refrattarie con deficit della produzione di eritrociti, del carcinoma mammario, dell'angioedema ereditario, nella carenza di antitrombina III e nella Sindrome di Turner [Drugbank - Nandrolone, 2012].

Deidroepiandrosterone (DHEA)

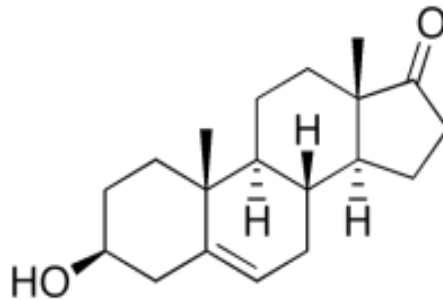


Figura 10- Formula chimica del DHEA

Il DHEA (**Figura 10**) è la forma sintetizzata del testosterone e, in quanto tale, condivide la sua capacità di favorire lo sviluppo della massa muscolare e promuovere lo sviluppo di 'caratteristiche maschili' [Houlihan, 1999]. Tuttavia la sua attività biologica confrontata con quella del testosterone è molto ridotta (da 5 a 20 volte) [Manduchi, 1995]. È un importante steroide prodotto principalmente dalla corteccia surrenale e, in piccole quantità dal testicolo e dall'ovaio. Può essere convertito a testosterone, androstenedione, estradiolo ed estrone. Il DHEA in America viene venduto liberamente sotto forma di integratori, mentre in Canada e Italia può essere acquistato solo dietro prescrizione medica. Spesso viene utilizzato come integratore per una serie di indicazioni prive di fondamento scientifico. Risultati promettenti, sostenuti da evidenze scientifiche, si sono avuti nella schizofrenia [Ritsner, 2011], nel miglioramento dell'aspetto della pelle in persone anziane (sembra che il DHEA per via orale aumenti lo spessore della pelle e l'umidità e diminuisca la comparsa di macchie senili facciali negli uomini e nelle donne) [Labrie, 2004] e nel miglioramento della capacità di raggiungere l'erezione negli uomini affetti da disfunzione sessuale [Reiter et al., 1999]. Infine il DHEA si è dimostrato promettente anche nel miglioramento di alcuni sintomi del lupus eritematoso (SLE) come dolore muscolare, ulcere alla bocca e rafforzamento delle ossa nei pazienti affetti da SLE [Crosbie et al., 2007; Chang et al., 2002]. Il DHEA è spesso prescritto in India per l'induzione dell'ovulazione aumentando la possibilità di gravidanza [Casson et al., 2000]. Viene naturalmente prodotto a partire dal colesterolo ad opera degli enzimi del citocromo P450 e può essere considerato come un proormone degli steroidi sessuali [Drugbank - Dehydroepiandrosterone, 2012].

Androstenedione

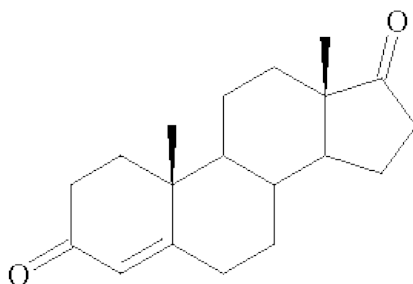


Figura 11- Formula chimica dell'androstenedione

L'androstenedione (**Figura 11**) è uno steroide che viene prodotto non solo nel testicolo ma anche nelle ovaie e corteccia surrenale. A seconda del tipo di tessuto, l'androstenedione può servire come precursore del testosterone nonché dell'estrone ed estradiolo [Manduchi, 1995]. È stato immesso sul mercato negli integratori alimentari per il possibile effetto anabolizzante. La maggior parte degli studi ha dimostrato un basso effetto anabolizzante negli uomini; tuttavia, è stato dimostrato che nelle donne può differenziare un marcato aumento del testosterone nel sangue ben al di sopra dei livelli fisiologici [Kicman et al., 2003]. Ciò ha ovvie implicazioni sulla salute delle donne, che assumono questi integratori per il loro potenziali effetti virilizzanti e altri. Le concentrazioni sieriche di estrogeni negli uomini possono aumentare con la somministrazione androstenedione, dando luogo ad un aumento del rischio di ginecomastia [Jickells and Negrusz, 2008].

Metandrostenolone

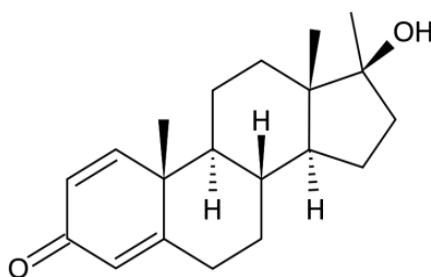


Figura 12- Formula chimica del metandrostenolone

Il metandrostenolone (**Figura 12**) è un efficace steroide anabolizzante attivo per via orale, sviluppato da John Zeilger e prodotto negli Stati Uniti nel 1960 dalla Ciba Specialty Chemicals [Fair, 1993]. È stato utilizzato in passato come ausilio per la crescita muscolare dai body

builder Americani fino al suo divieto da parte del Congresso degli Stati Uniti in base alla legge che regola le sostanze dopanti. Nonostante ciò si può ancora trovare in commercio e può essere acquistato facilmente in alcuni siti internet [Cordaro et al., 2011].

1.6 PRINCIPALI PIANTE UTILIZZATE NEGLI INTEGRATORI PER LA PERDITA DI PESO E L'ATTIVITÀ SPORTIVA

1.6.1 *Citrus aurantium* L.

Il *Citrus aurantium* L., **Figura 13**, pianta appartenente alla famiglia delle Rutaceae, è un albero sempreverde con foglie sparse ovate coriacee, fiori bianchi odorosi e frutti sferici gialli [Da Legnano, 1973]. Contiene un'ampia gamma di costituenti tra cui glucosidi flavonoici (esperidina), cumarina, polimetossiflavoni, aldeidi, amine e monotерpeni.



Figura 13 - Rappresentazione di un ramo del *Citrus aurantium*. Sono visibili le foglie, i frutti, i fiori, i semi e le bacche

I principali principi attivi sono due: l'octopamina e la sinefrina, contenute soprattutto nella buccia del frutto immaturo. La sinefrina sembrerebbe essere presente in quantità maggiori nei frutti di piccolo diametro, se confrontati con quelli più grandi, probabilmente per i più alti livelli di sinefrina presenti nella buccia che diminuiscono con la maturazione del frutto [Penzak et al., 2001].

1.6.1.1 Uso storico e attuale

Il *Citrus aurantium* L. è stato poco utilizzato in ambito alimentare, a causa del sapore acre dei suoi frutti, che sono tuttavia inclusi tra gli ingredienti della cucina di alcune popolazioni asiatiche e sudamericane. La buccia essiccata invece è utilizzata per aromatizzare bevande alcoliche. L'utilizzo più frequente e storicamente più importante della pianta è tuttavia quello relativo alla medicina tradizionale asiatica per il trattamento dei disturbi del tratto gastrointestinale ma anche nella medicina tradizionale occidentale come stimolante della secrezione gastrica.

Oggi il suo utilizzo è soprattutto associato a quei prodotti che hanno lo scopo di favorire la perdita di peso corporeo. La messa al bando dei prodotti a base di *Ephedra* da parte del FDA ha favorito lo sviluppo di integratori alimentari "ephedra free" che contengono, oltre al *C. aurantium*, una varietà di piante tra le quali troviamo quelle contenenti caffeina, ad esempio *Camelia sinensis* (tè verde), *Paulinia cupana* (guaranà), *Cola acuminata*, *C. nitida* (noce di cola), *Ilex paraguayanensis* (matè o yerba matè) e *Theobroma cacao* (cacao). Ma l'attenzione dei media e recentemente dell'FDA è rivolta verso l'estratto di arancio amaro e il suo contenuto in sinefrina.

1.6.1.2 Aspetto Legislativo

Il Ministero della Salute Italiano ha inserito il *Citrus aurantium* nell'elenco degli estratti vegetali ammessi negli integratori alimentari [Ministero della Salute, 2012], ma con limitazioni. In Italia la Circolare n. 3 del 18 luglio 2002, pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale n. 188 del 12/08/2002, riporta avvertenze specifiche per prodotti contenenti alcuni ingredienti vegetali. Riguardo il *Citrus aurantium* la circolare riporta che "l'apporto giornaliero di sinefrina con le quantità d'uso indicate non deve superare i 30 mg, corrispondenti a circa 800 mg di *Citrus aurantium* con un titolo del 4% di tale sostanza. Avvertenze: non superare la

dose giornaliera consigliata. In presenza di cardiovasculopatie e/o ipertensione, prima di assumere il prodotto, consultare il medico. Si sconsiglia l'uso in gravidanza, durante l'allattamento e al di sotto dei 12 anni" [Ministero della Salute, 2002].

Negli Stati Uniti il *Citrus aurantium* è inserito nel Poisonous Plants Database (PPD), tuttavia la FDA ha solo proposto, ma non stabilito la proibizione della vendita dei prodotti contenenti estratti di pianta o sinefrina. Nel succo d'arancia concentrato, il volume di succo d'arancia amara non può eccedere il 5%. L'olio estratto dalla buccia, i fiori e le foglie sono altresì inseriti nel database americano degli additivi alimentari Everything Added to Food in the United States (EAFUS) [EAFUS, 2011]. In Canada la vendita di prodotti utilizzati per la perdita di peso contenenti *Citrus aurantium* o sinefrina è vietata. Queste diverse situazioni sottolineano l'importanza di un'armonizzazione tra i vari paesi relativa a sostanze di origine naturale con un'importante azione farmacologica al fine di salvaguardare la salute dei consumatori [Pichini et al., 2010].

1.6.2 *Pausinystalia yohimbe*

La *Pausinystalia yohimbe* (**Figura 14**) è un albero grande sempre verde con grandi foglie coriacee curve ai margini e fiori bianchi a ombrello. Contiene fino al 6% di alcaloidi totali quali la yohimbina che è l'alcaloide principale, a-yohimbina, delta-yohimbina, allo-yohimbina e corinanteina.

La qualità e la quantità di yohimbina nella corteccia è altamente variabile, raggiungendo l'optimum quali-quantitativo nella corteccia dei fusti principali. La stessa concentrazione di principio attivo è soggetta a oscillazioni stagionali, essendo massima durante la stagione delle piogge e minima durante la stagione secca. Normalmente si utilizza la corteccia sminuzzata sciolta in acqua o alcol [Pichini et al., 2010].



Figura 14 – Principali parti della pianta
Pausinystalia yohimbe

1.6.2.1 Uso storico e attuale

L'uso storico della *Pausinystalia yohimbe* è quello che la vede impiegata come afrodisiaco. La pianta viene consumata polverizzando o macinando la corteccia ed è assunta come liquido dopo la bollitura in acqua assieme ad altre erbe.

La yohimbina è utilizzata principalmente nel trattamento dell'impotenza maschile e nel trattamento di una vasta gamma di problemi di tipo vascolare. La yohimbina presenta anche un'azione ansiogenica [Matthew et al., 2006; Shepard et al., 2004]. Inoltre la yohimbina viene talvolta utilizzata dagli atleti per aumentare le proprie prestazioni, nonché dai cantanti per ottenere maggior chiarezza del tono di voce durante le lunghe tournée [Pichini et al., 2010].

E' possibile trovare ed acquistare *P. yohimbe* in capsule, spesso in miscela insieme ad altre erbe come ad esempio: *Turnera diffusa* (damiana), *Panax ginseng* L. (ginseng), *Paullinia cupana* (guaranà), *Ptychopetalum* sp. (muira puama) su siti Internet. Il consumatore viene attratto dalle proprietà afrodisiache pubblicizzate: "aumenta le sensazioni erotiche e sessuali, è afrodisiaco e potenzia il vigore sessuale" [Pichini et al., 2010].

1.6.2.2 Legislazione

In Italia né yohimbina, α -yohimbina, delta-yohimbina, allo-yohimbina, corinanteina, né l'intera pianta o parte di essa sono inserite nelle tabelle delle sostanze stupefacenti o psicotrope sottoposte alla vigilanza ed al controllo di cui all'articolo 14 del Decreto del Presidente della Repubblica 309/90 e successive modifiche. Tuttavia, in Italia, la *P. yohimbe* è inserita nell'elenco del Ministero della Salute, degli estratti vegetali non ammessi negli integratori alimentari [Sunderland et al., 2000]. Anche la Finlandia, la Norvegia, l'Australia e il Canada hanno reso illegale la vendita e il commercio della *P. yohimbe* perché ritenuta pericolosa per la salute. La pianta non è sottoposta a controllo negli Stati Uniti: è possibile infatti comprare, vendere, coltivare e possedere senza licenza o prescrizione l'intera pianta o i suoi estratti. Qualora la pianta o i suoi derivati siano venduti come integratori alimentari, occorre che la vendita sia conforme alle leggi Statunitensi relative agli integratori.

1.6.2.3 Proprietà farmaco-tossicologiche

La yohimbina è un potente antagonista dei recettori α -1 adrenergici [Langer, 1980]; incrementando la dose si ha blocco dei recettori serotoninergici e dopaminergici, mentre a dosi ancora più elevate la sostanza può agire da anestetico locale [Goldberg e Robertson, 1983].

A livello centrale la yohimbina è in grado di bloccare i recettori α -2 adrenergici pre-sinaptici con aumento del rilascio di noradrenalina e aumento dell'attività simpatica [Brunton et al., 2006]. L'effetto della yohimbina è più marcato sui recettori α -adrenergici pre-sinaptici piuttosto che su quelli post-sinaptici [Brown, 1980; Drew, 1976]. Studi in vivo sull'animale hanno dimostrato che la yohimbina somministrata alle dosi di 0.5 - 1 mg/kg per via intraperitoneale è in grado, agendo sui recettori adrenergici, di antagonizzare in maniera significativa gli effetti comportamentali indotti dalla dietilamide dell'acido lisergico [Mustafa et al., 2005].

A livello simpatico la yohimbina incrementa l'attività colinergica e riduce l'attività adrenergica. La sua azione sui vasi sanguigni periferici è simile a quella della reserpina sebbene l'effetto sia più rapido e di minore durata. Nell'uomo, la yohimbina potrebbe influenzare il comportamento sessuale [Riley, 1994]. L'alcaloide, infatti, attraverso il blocco dei recettori α -2 adrenergici, incrementa l'afflusso e riduce il deflusso sanguigno a livello dei corpi cavernosi mantenendone il riempimento e quindi l'erezione [Baum, 1987]. Studi condotti su animali hanno permesso di dimostrare che tale alcaloide è in grado di favorire l'erezione in topi mentre non sono ancora presenti validi studi condotti sull'uomo [Morales, 2000].

La yohimbina agisce da stimolante centrale e ad alte dosi può esercitare un effetto ansiogeno [Matthew et al., 2006; Shepard et al., 2004]. Responsabili di questo effetto, prevenuto dalla somministrazione di diazepam, potrebbero essere il blocco dei recettori α -2 adrenergici ed un aumento del rilascio corticale di sostanze colecistochinino-simili [Becker et al., 1999]. In uno studio condotto su volontari sani è stato dimostrato che la yohimbina, somministrata per via orale, inibisce ex vivo l'aggregazione piastrinica indotta dall'adrenalina. Nello studio il farmaco è stato somministrato in singole dosi di 4, 8 e 12 mg. L'effetto antiaggregante è stato osservato a partire dalla dose di 8 mg e alla dose di 12 mg la durata dell'effetto si è prolungato per almeno 10 ore. Nessuna delle dosi somministrate ha determinato variazioni della pressione ematica, della frequenza cardiaca o dei livelli plasmatici di catecolamine e glucosio [Berlin et al., 1991]. La yohimbina oltrepassa con facilità la barriera ematoencefalica e, una volta nel sistema nervoso centrale, antagonizza i recettori serotoninergici periferici, causa incremento dell'attività motoria, eccitazione, tremori e rilascio di ormone antidiuretico (ADH). La liberazione di ADH causa, a sua volta, ritenzione idrica, incremento della pressione ematica e della frequenza cardiaca [Brunton et al., 2006].

1.6.2.4 Effetti avversi

Gli effetti avversi associati all'uso di yohimbina includono incremento della pressione ematica e della frequenza cardiaca, stati di ansia, sonnolenza e sintomi maniacali [Lacomblez et al., 1989; Fleming, 1998; Tyler, 1994]. In letteratura è riportato il caso di un uomo di 42 anni che, in seguito all'assunzione di yohimbina per il trattamento dell'impotenza, ha sviluppato un'eruzione cutanea eritrodermica accompagnata da insufficienza renale progressiva e da una sindrome simil-lupoide [Sandler e Aronson, 1993]. In un altro paziente affetto da impotenza, a seguito dell'assunzione di yohimbina, si è manifestata una reazione avversa caratterizzata da broncospasmo. Alla base di questa reazione sembra esserci un aumento del tono colinergico con conseguente incremento delle contrazioni e delle secrezioni bronchiali [Sandler e Aronson, 1993]. È stato anche descritto un caso di priapismo refrattario al trattamento associato alla ingestione di un estratto della pianta che ha richiesto l'effettuazione di uno shunt (passaggio di sangue) a livello dei corpi cavernosi [Landis e Shore, 1989]. Negli ultimi anni si è diffuso il consumo di yohimbina tra i body builder per i suoi presunti effetti lipolitici e simpaticomimetici. È stato riportato il caso di un body builder italiano di 37 anni che ha manifestato sintomi quali

malessere, vomito, ipertensione arteriosa, perdita di coscienza e convulsioni a seguito dell'ingestione di elevate quantità di yohimbina (5 g) [Giampreti et al., 2009].

1.6.2.5 Interazioni farmacologiche

La yohimbina può interagire con numerosi farmaci causando reazioni avverse. Alcuni esempi di interazioni sono:

- ✓ Inibitori delle monoamino-ossidasi: si può avere amplificazione degli effetti ipertensivi [Fugh-berman, 2000].
- ✓ Antiipertensivi: la yohimbina può causare riduzione della efficacia dei farmaci antiipertensivi [Musso et al., 1995].
- ✓ Carbamazepina, litio e acido valproico: la yohimbina può determinare aumento del rischio di episodi maniacali in pazienti bipolari e non, trattati con questi farmaci [Price et al., 1984].
- ✓ Sinefrina ed efedrina: la yohimbina può causare crisi ipertensive se associata alla sinefrina ed efedrina [Firenzuoli, 2005].

1.6.3 *Ephedra sinica*

L'*Ephedra sinica* (**Figura 15**) è una pianta legnosa perenne a rami sottili, a volte tortuosi e quasi volubili, articolato - nodosi. Le parti aeree delle diverse specie di *Ephedra sinica* contengono percentuali variabili (ma comunque comprese tra lo 0,02% ed il 3,4%) di sei alcaloidi concentrati essenzialmente a livello degli internodi dei fusti. L'efedrina è l'alcaloide presente in quantità dominante (50 - 85% degli alcaloidi contenuti nell'erba essiccata), seguito dalla d-pseudoefedrina (~25%) e da minor quantità di norefedrina, norpseudoefedrina, metilefedrina, metilpseudoefedrina. Sono anche presenti: glicani (efedrani A-E), oli volatili (limonene, carofillene, fellandrene ed altri), piccole quantità di saponine, catechine e tannini [Abourashed et al., 2003].



Figura 15 - Rappresentazione delle parti aeree di *Ephedra sinica*

1.6.3.1 Uso storico e attuale

In passato l'efedrina è stata utilizzata come stimolante del sistema nervoso centrale nella narcolessia e stati depressivi [Chen et al., 2010]. La pianta veniva utilizzata anche per indurre diaforesia, nel ridurre le crisi asmatiche e nell'indurre diuresi [Reid, 1987].

La maggior parte degli integratori alimentari che contengono *Ephedra sinica*, sono commercializzati con l'obiettivo di fornire un aiuto per la perdita di peso o migliorare le prestazioni atletiche. Spesso tali integratori venivano venduti in associazione ad altri prodotti contenenti fonti naturali di caffeina come la *Paulinia cupana* (guaranà) e *Cola nitida* (kolanut) al fine di aumentare gli effetti dell'efedrina e per ottenere una combinazione di droghe definite "eccitanti" [Pichini et al., 2010]. Un quantitativo tipico di caffeina offerto nei "mix" di erbe varia tra i 40 ed i 200 mg di prodotto [Haller et al., 2002]. Si stima che, solo nel 1999, 12 milioni d'individui negli Stati Uniti abbiano usato 3 miliardi di dosi d'alcaloidi dell'*ephedra* [Brunton et al., 2006]. L'efedrina trova impiego anche come principio attivo di farmaci utilizzati per il trattamento dell'asma bronchiale e del raffreddore [Brunton et al., 2006].

1.6.3.2 Legislazione

Il Ministero della Salute ha inserito la pianta erbacea e gli steli dell'*Ephedra sinica* nell'elenco degli estratti vegetali non ammessi negli integratori alimentari [Ministero della Salute, 2009].

L'efedrina, la pseudoefedrina e la norefedrina sono inserite nella categoria 1 dell'allegato I per le sostanze classificate di cui al decreto legislativo n. 258 del 12 Aprile 1996 (G.U. 112 del 15/05/1996) che riguarda il recepimento della direttiva 92/109/CEE relativa alla fabbricazione e all'immissione in commercio di talune sostanze impiegate nella fabbricazione illecita di sostanze stupefacenti e psicotrope. Tale allegato è presente nel testo aggiornato del DPR 309/90 (G.U. n.62 del 15/03/06). L'efedrina, la pseudoefedrina e la metilefedrina sono inserite nella lista dei farmaci, delle sostanze farmacologicamente attive di cui all'articolo 1 della legge n. 376/00: "Disciplina della tutela sanitaria delle attività sportive e della lotta contro il doping" pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 294 del 18 dicembre 2000. Tale lista è stata approvata con Decreto Ministeriale del 15 ottobre 2002 e pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 278 del 27 novembre 2002 [Pichini et al., 2010].

Nel 2004 la Food and Drug Administration (FDA), ha affermato che gli integratori contenenti efedrina comportano rischi per la salute a breve e lungo termine. Per tale motivo, la medesima FDA ha deciso di proibire tutti i prodotti che contengano dei derivati dell'efedrina [FDA, 2004]. Un campione di urine viene giudicato positivo durante un controllo antidoping quando presenta una concentrazione di efedrina e metilefedrina pari o superiore a 10 µg/mL [Ministero della Salute, 2009].

1.6.3.3 Proprietà farmaco-tossicologiche

Le proprietà farmacologiche dell'*Ephedra sinica* sono dovute alla presenza di efedrina, pseudoefedrina ed altri alcaloidi strutturalmente correlati. L'efedrina e la pseudoefedrina sono agenti simpaticomimetici dotati di attività agonista, sia diretta che indiretta, nei confronti dei recettori α e β -adrenergici e stimolanti del sistema nervoso centrale [Martindale, 1999].

Solo una piccola parte di efedrina viene metabolizzata ad opera del fegato, le principali reazioni che la sostanza subisce sono: N-demetilazione (8 - 20%) e deaminazione (4 - 13%). La maggior parte di efedrina (circa il 53 - 74%) viene invece escreta in forma immodificata con le urine. L'escrezione urinaria, per la presenza di un amino gruppo ionizzabile, viene favorita dal pH acido delle urine [Sever et al., 1975]. A livello centrale l'efedrina esercita un potente effetto stimolante trovando impiego come ingrediente ad azione anoressizzante centrale contenuto in prodotti dimagranti e per il trattamento della narcolessia e degli stati depressivi. A livello cardiovascolare

determina l'incremento della forza di contrazione del cuore, aumento dell'output cardiaco e vasocostrizione periferica con un conseguente aumento sia della pressione sistolica che della diastolica [Brunton et al., 2006].

1.6.3.4 Tossicità

La DL50 dell'*Ephedra sinica* e dell'efedrina sono rispettivamente 5.4 g/kg e 64.9 mg/kg mentre gli altri principi attivi della pianta (per es. la pseudoefedrina) risultano essere meno attivi rispetto all'efedrina. Tuttavia, l'assorbimento dell'efedrina presente nella matrice estratta di *Ephedra sinica* è minore rispetto a quello della sostanza pura.

Queste osservazioni suggerirebbero una minore tossicità dell'estratto di *Ephedra sinica* rispetto a quella dell'efedrina isolata [Gurley et al., 1998; White et al., 1997]. Tuttavia autori sostengono che il potenziale neurotossico degli estratti della pianta è maggiore rispetto a quello dell'efedrina sintetica, in virtù dell'effetto sinergico esercitato dalla frazione alcaloidea dell'estratto o per la presenza nella pianta di altri principi attivi non ancora identificati [Lee et al., 2000; Gurley et al., 1998; White et al., 1997].

L'assunzione di integratori alimentari a base di *Ephedra sinica* e caffeina incrementa la pressione arteriosa; in particolare è stato osservato che l'assunzione di una singola dose orale di un'associazione contenente efedrina e caffeina (rispettivamente 20 mg e 200 mg) causa un incremento della pressione sistolica pari a 14 mmHg e della pressione diastolica pari a 6 mmHg [Haller et al., 2002]. In uno studio condotto su soggetti sani, sono state studiate le variazioni pressorie in seguito alla somministrazione orale di efedrina (0.1 mg/kg), caffeina (4 mg/kg) e delle due sostanze associate, i risultati ottenuti vengono confrontati con un placebo. Per la caffeina è stato osservato, rispetto al placebo, un incremento della pressione arteriosa compreso tra 3 e 6 mmHg, per l'efedrina l'incremento pressorio è risultato pari a 12 mmHg. L'associazione delle due sostanze ha determinato un aumento della pressione, rispetto al placebo, pari a 15 mmHg [Jacobs et al., 2003; Berlin et al., 2001].

1.6.3.5 Effetti avversi

A livello cardiovascolare l'efedrina può indurre ipertensione arteriosa, vasocostrizione, tachicardia, palpitazioni, ischemia del miocardio e arresto cardiaco [Burkhart, 1992] e favorire l'insorgenza di ictus ischemico o emorragico [Pentel, 1994]. In letteratura viene riportato il caso di una donna di 35 anni affetta da broncospasmo che ha manifestato una cardiomiopatia in seguito all'uso cronico di dosi elevate di efedrina [Haller e Benowitz, 2000]. Una metanalisi che ha esaminato studi clinici sugli effetti di preparati a base di *Ephedra sinica* o di efedrina tal quale, ha dimostrato che l'uso di *Ephedra sinica* da sola o in associazione ad altri estratti contenenti caffeina o ad altre sostanze deputate alla perdita di peso, aumentano il rischio di aritmie cardiache e di disturbi gastrointestinali, psichiatrici e del sistema nervoso autonomo [Shekelle et al., 2003]. In seguito dell'assunzione di integratori alimentari a base di *Ephedra sinica* negli Stati Uniti sono stati segnalati più di 800 casi di effetti collaterali, rappresentati da psicosi, attacchi cardiaci e ictus [Lee et al., 2000].

Alcuni studi hanno evidenziato che il 50% dei consumatori non aveva più di 35 anni e che la maggior parte di essi aveva goduto sino a quel momento di buona salute [Shekelle et al., 2003]. Altri effetti avversi associati all'uso di efedrina sono: tremori, stati di ansia e di confusione, irrequietezza, insonnia e stati psicotici; in seguito ad overdose possono manifestarsi psicosi paranoiche e allucinazioni [Martindale, 1999].

1.6.3.6 Interazioni farmacologiche

L'efedrina può interagire con gli inibitori delle monoamminoossidasi (MAO) causando un incremento dei livelli di noradrenalina con conseguente aumento del tono simpatico. In seguito a questa interazione si possono manifestare sintomi quali cefalea, febbre, aritmie e crisi ipertensive. Pertanto l'efedrina non dovrebbe essere assunta da pazienti in trattamento con inibitori delle MAO o da pazienti che hanno sospeso il trattamento con tali farmaci da meno di 14 giorni [Blumenthal et al., 1998].

L'efedrina può ridurre l'efficacia di farmaci appartenenti alla classe degli antipertensivi [Zahn et al., 1999] e associata alla clonidina può causare un incremento della noradrenalina con innalzamento della pressione arteriosa [Nishikawa et al., 1991]. Può inoltre incrementare il metabolismo dei corticosteroidi riducendone il livello plasmatico: questa interazione è molto importante nel caso in cui un paziente asmatico che segue una terapia con farmaci corticosteroidi, assuma prodotti a base di *Ephedra sinica* [Brooks et al., 1977]. Se l'efedrina viene associata a farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), può favorire l'insorgenza di lesioni alla

mucosa gastrica [Cho et al., 2002]. Infine bisogna considerare l'associazione tra efedrina e caffeina. Quest'ultima infatti può potenziare gli effetti simpaticomimetici dell'efedrina e causare tachicardia, ipertensione, ictus e aritmie cardiache [Haller et al., 2000].

1.7 PROGETTO PLANTLIBRA

PlantLIBRA è l'acronimo di Plant Food Supplements: Levels of Intake, Benefit and Risk Assessment (ovvero Integratori alimentari contenenti piante: Livelli di assunzione e valutazione del rischio/beneficio). È un progetto finanziato dalla Comunità Europea nell'ambito del Settimo Programma Quadro (EC 245199) e coordina 25 partners distribuiti su 4 continenti: Europa (21 Partners, 20 appartenenti alla CE più la Svizzera), Asia (Cina), Africa (Sud Africa), Sud America (Argentina e Brasile).

La missione di PlantLIBRA è quella di promuovere l'uso sicuro degli integratori alimentari, contenenti ingredienti botanici, mediante la produzione di dati scientifici e modelli di intervento che possano essere utilizzati dagli organismi responsabili della legislazione e della valutazione del rischio. Il progetto vuole anche supportare, con la sua attività, gli operatori del settore al fine di ottimizzare la qualità dei prodotti e la sicurezza del consumatore.

PlantLIBRA si articola nelle seguenti attività:

- ✓ Indagine sull'assunzione di integratori alimentari contenenti ingredienti botanici (Plant Food Supplements - PFS) in Europa;
- ✓ Studio degli effetti benefici dei PFS e sviluppo di modelli per la valutazione dei possibili effetti salutistici;
- ✓ Nuovi approcci per la valutazione del rischio dei PFS;
- ✓ Studio degli eventi avversi associati a PFS (reazioni avverse, errori di riconoscimento, interazioni con farmaci);
- ✓ Integrazione dei modelli di valutazione del rischio/beneficio: loro sviluppo e validazione.

Tra i diversi ambiti d'attività, il progetto prevede la valutazione e determinazione del rischio/beneficio connesso all'utilizzo di integratori alimentari a base di ingredienti vegetali attraverso una raccolta di dati già presenti nella letteratura scientifica ed indagare sulla sicurezza dei

prodotti a base di ingredienti vegetali che trovano maggior riscontro sul mercato tenendo conto dei dati presenti nella letteratura scientifica.

Inoltre, PlantLIBRA intende produrre dati scientifici a sostegno dell'utilizzo di integratori alimentari contenenti piante o preparati a base di piante, al fine di facilitare il compito delle autorità regolatorie e di tutti gli operatori della catena alimentare. Il progetto è strutturato per sviluppare, convalidare e diffondere dati e metodologie per valutare i rischi ed i benefici di tali prodotti e per attuare una cooperazione internazionale sostenibile.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Lo sviluppo del mercato degli integratori alimentari con particolare interesse per quei prodotti destinati a incrementare le prestazioni sportive, ha portato alla necessità di verificare la sicurezza di questi prodotti. Diversi studi che hanno analizzato alcuni di questi prodotti, hanno rilevato la presenza di sostanze farmacologicamente attive e non riportate in etichetta, diventando in questo modo prodotti potenzialmente pericolosi per la salute del consumatore.

Questi prodotti, principalmente quelli a base di piante, sono solitamente considerati come “naturali” e privi di effetti indesiderati. Spesso vengono usati dai pazienti a propria discrezione, in modo non controllato e senza consiglio medico. Inoltre, alcuni di questi integratori non sono mai stati inclusi in studi clinici che comprovano la loro efficacia e/o sicurezza e per alcuni di questi prodotti è stato dimostrato la non corrispondenza tra il contenuto indicato in etichetta e quello reale. Questo significa che il consumatore potrebbe comprarli, o eventualmente importarli se non reperibili nel mercato del proprio Stato, senza alcuna difficoltà, ma anche senza ricevere alcuna garanzia sulla loro qualità. Oltre al rischio che questi prodotti possono comportare per la salute del consumatore, c'è il rischio per gli atleti professionisti di incorrere in risultati di positività nei test antidoping legato all'assunzione involontaria di principi attivi banditi dal regolamento con conseguenze anche molto serie.

Fino a poco tempo fa gli integratori alimentari erano soggetti a leggi diverse nei vari Stati Membri dell'Unione Europea. Attualmente la Direttiva Europea ha avuto come obiettivo quello di creare una legislazione comune a tutti i paesi in modo da garantire ai consumatori l'acquisto di prodotti comparabili e favorire la libera circolazione delle merci. Tuttavia, ogni paese può applicare le proprie norme nazionali relative alla composizione dei prodotti botanici. Alcuni Stati Membri hanno norme specifiche ed elenchi positivi e/o negativi, mentre altri hanno solo disposizioni generali. In alcuni Stati Membri, l'uso di erbe è generalmente ammesso, mentre in altri è fortemente limitato. Queste situazioni dimostrano come sia necessario applicare una procedura di armonizzazione delle normative relative ai prodotti botanici.

L'aumentato consumo di integratori alimentari, la necessità di una maggiore tutela del consumatore e il bisogno di creare un mercato comune Europeo per questi prodotti richiede l'adozione di una specifica regolamentazione. Le autorità competenti e le imprese alimentari hanno bisogno di informazioni scientifiche relative alla qualità e sicurezza di questi prodotti,

incluso quelli importati dall'estero. Inoltre, è fondamentale informare gli atleti ma anche gli sportivi dilettanti che la presenza di un ingrediente di origine naturale può non garantire la totale sicurezza del prodotto poiché molte piante contengono principi attivi vietati o monitorati.

Lo scopo della prima parte del lavoro è stato quello di effettuare una revisione sistematica sugli effetti negativi degli integratori alimentari contenenti la pianta *C. aurantium*, da sola o in associazione con altri composti stimolanti. I dati sugli eventi avversi nell'uomo dopo la assunzione di questi prodotti sono stati raccolti in letteratura ed una valutazione della causalità dei casi clinici, quando non specificato, è stata fatta in conformità alla Guideline di Farmacovigilanza della Organizzazione Mondiale della Salute [WHO, 2012].

Lo scopo della seconda parte di questa tesi è stato quello di verificare il contenuto di ammine attive sorvegliate o non ammesse e steroidi in integratori alimentari, con particolare attenzione ai prodotti a base di estratti vegetali. Diversi approcci analitici sono stati utilizzati per la rilevazione e la quantificazione dei composti in ricerca: Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) e Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS). Questa indagine ha nel contempo permesso di verificare la veridicità delle informazioni riportate in etichetta confrontandole con il reale contenuto delle sostanze dosate in questi prodotti.

Questa ricerca rientra nelle attività del Progetto Europeo PlantLIBRA (Plant Food Supplements: Levels of Intake, Benefit and Risk Assessment). Il progetto si colloca nell'ambito del Settimo Programma Quadro Europeo, volto a valutare l'efficacia e sicurezza d'uso degli integratori alimentari contenenti piante e derivati a supporto di azioni di tipo regolatorio.

3. MATERIALI

3.1 STANDARD PURIFICATI

- Yohimbina cloridrato titolo minimo 98% (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis USA)
- Efedrina titolo minimo 99% (Sigma-Aldrich Chemie Schnnelldorf, Germania)
- Sinefrina titolo minimo 98% (Sigma-Aldrich Chemie Schnnelldorf, Germania)
- Octopamina cloridrato titolo minimo 95% (Sigma-Aldrich Chemie Schnnelldorf, Germania)
- Norefedrina titolo minimo 99% (Sigma-Aldrich Chemie Schnnelldorf, Germania)
- Vinpocetina titolo minimo 98% (Sigma-Aldrich Chemie Schnnelldorf, Germania)
- Evodiamina (Sigma-Aldrich Chemie Schnnelldorf, Germania)
- Androstenedione titolo minimo 99.1% (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA)
- Deidroepiandrosterone titolo minimo 99% (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA)
- Metandrostenolone titolo minimo 99% (Sigma-Aldrich Chemie, St Louis, USA)
- Nandrolone titolo minimo 99.9% (Sigma-Aldrich Chemie, Schnnelldorf, Germania)
- Stanazololo titolo minimo 99.71% (Steroid S.p.A)
- Testosterone titolo minimo 99.9% (Sigma-Aldrich Chemie, Schnnelldorf, Germania)
- Testosterone enantato titolo minimo 97% (Steroid S.p.A)
- 17- α Estradiolo titolo minimo 98% (Sigma-Aldrich Chemie, Schnnelldorf, Germania)
- Progesterone titolo minimo 98% (Sigma-Aldrich Chemie, Schnnelldorf, Germania)

3.2 SOLVENTI

- Metanolo (Merck KGaA, Darmstadt, Germania)
- Cloroformio (Sigma-Aldrich Chemie, Schnnelldorf, Germania)
- Acqua per HPLC (Sigma-Aldrich Chemie, Schnnelldorf, Germania)
- Etanolo 96% (Sigma-Aldrich Chemie, Schnnelldorf, Germania)
- Acetone (Sigma-Aldrich Chemie, Schnnelldorf, Germania)

3.3 SALI, ACIDI E BASI

- Sodio dodecil solfato (BIO-RAD, Hercules, USA)
- Potassio diidrogeno fosfato (Merck KGaA, Darmstadt, Germania)
- Acido fosforico (Merck KGaA, Darmstadt, Germania)
- Acido cloridrico 0.1 M (Sigma-Aldrich Chemie, Schnneildorf, Germania)
- Acido solforico 95-97% (Merck KGaA, Darmstadt, Germania)
- Acido formico (Sigma-Aldrich Chemie, Schnneildorf, Germania)
- Ammoniaca 32% (Merck KGaA, Darmstadt, Germania)
- Idrossido d'ammonio (Merck KGaA, Darmstadt, Germania)

3.4 LASTRE PER TLC

- Lastre di gel di silice con indicatore di fluorescenza 60-F254 (Merck KGaA, Darmstadt, Germania)

3.5 REATTIVI PER LO SVILUPPO DELLE LASTRE TLC

- Reattivo alla Ninidrina (Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, USA)
- Reattivo di Dragendorff (Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, USA)
- Soluzione 5% acido solforico in etanolo

3.6 CARTUCCE PER SOLID PHASE EXTRACTION (SPE)

- SPE Strata SCX -55 μ m, 70A- 500 mg/6mL SPE Cartridge (Phenomenex, Italia)
- HyperSep Retain PEP, 60MG/3ML SPE Column,50 PKG (Thermo scientific, Bellefonte, USA)
- HyperSep SPE, 500MG/2.8ML C-18 Hypersil PK/50 (Thermo scientific, Bellefonte, USA)

3.7 SOLUZIONI

- Ammonio formiato 0.01 M (Carlo Erba Reagenti SpA)

- Reattivo alla Ninidrina 0.2% in etanolo (p/v)
- Soluzione diluente: 30 mL di metanolo in 970 mL di acqua per HPLC; si aggiungono 1.3 g di potassio diidrogeno solfato e si agita fino a completa dissoluzione del sale
- Soluzione di acido solforico 50 mM
- Soluzione di acido solforico 500 mM
- Soluzione per SPE: 5 mL di NH_4OH in 95 mL di metanolo
- Soluzione 5% acido solforico in etanolo

3.8 STRUMENTAZIONE HPLC

- Pompe PU-880 Jasco (Tokyo, Giappone) per HPLC
- Detector a fluorescenza FP-1520 Jasco (Tokyo, Giappone)
- Detector UV/Visibile Jasco (Tokyo, Giappone)
- Valvola di campionamento Rheodyne modello 7725 con loop da 100 μL (Cotati, CA, USA)
- Software per integrazione ed impostazione dei dati cromatografici Borwin Jasco (Tokyo, Giappone)

3.9 STRUMENTAZIONE LC-MS

- Sistema HPLC Surveyor MS Pump Plus accoppiato a spettrometro di massa a trappola lineare LCQ Deca XP MAX (Thermo Electron Co, San Jose, CA, USA)
- Autocampionatore Surveyor Autosampler Plus (Thermo Electron Co, San Jose, CA, USA)
- Software per Integrazione Excalibur® Release 2.0 SR2 (Thermo Electron Co, San Jose, CA, USA)

3.10 COLONNE E PRE-COLONNE PER LC

- Colonna LiChrospher RP-18, 250 x 4 mm ID, diametro medio particelle 5 μm (Merck, Darmstadt, Germania)
- Colonna Reprospher C8-Aqua, 250 x 4.6 mm, 5 μm (Dr. Maisch, Germania)
- Pre-colonna LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (Merck, Darmstadt, Germania)

- Colonna Hypersil GOLD aQ, 2.1x100 mm, 3 µm (Thermo Fischer, San Jose, CA, USA)
- Colonna ODS-2 C18 Inertsil, 2.1x150mm, 5 µm (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan)
- Colonna Hypersil GOLD 3x100 mm, 3 µm (Thermo Fischer, San Jose, CA, USA)

3.11 MATRICE UTILIZZATA COME BIANCO

- Iperico (ABOCA S.p.A., Pistrino di Citerna, PG, Italia)

3.12 CAMPIONI

I campioni analizzati in questo studio sono stati sequestrati dal NAS (Nucleo Anti Sofisticazioni) per essere sottoposti ad indagine al fine di verificare la presenza di ammine attive ed ormoni steroidei.

- Ricerca di ammine attive: dei 44 campioni analizzati per la ricerca di ammine, 41 erano integratori alimentari complessi nella cui composizione vi era una grande varietà di estratti di piante, vitamine, aminoacidi, ecc. Gli altri 3 campioni erano integratori alimentari multivitaminici e multiminerali.
- Ricerca di ormoni steroidei: Sono stati analizzati 35 campioni per la ricerca di ormoni steroidei. Essi comprendevano 22 integratori alimentari a base di piante che potevano contenere anche altre sostanze come vitamine e aminoacidi e 13 prodotti destinati allo sportivo.

4. METODI

A-Ricerca sistematica

Data l'importanza che la pianta *C. aurantium* rappresenta nel mercato degli integratori alimentari ed essendo questa, tra le piante considerate in questo lavoro, l'unica pianta ammessa per il consumo in Italia, si è deciso di effettuare una ricerca sistematica sui possibili casi di reazioni avverse riscontrate in letteratura riguardanti la pianta o prodotti che la contengono.

Casi clinici pubblicati fino a febbraio 2012 sono stati sistematicamente cercati in PubMed/MEDLINE, Embase e Natural Medicines Comprehensive Database. Sono stati utilizzati i seguenti termini di ricerca:

“adverse effect/s”, “poisoning/s”, “plant food supplement/s”, “misidentification/s” ed “interaction/s” in combinazione con il nome scientifico della pianta "*Citrus aurantium*" o il suo nome comune “Bitter orange”

I limiti della ricerca sono stati studi e casi sull'uomo, le lingue appartenenti alla Comunità Europea e documenti che segnalavano la somministrazione di integratori contenenti *C. aurantium* estratto o materiale botanico greggio destinati ad uso orale.

Per valutare la causalità di casi clinici, quando non specificato, è stata utilizzata la Guideline di Farmacovigilanza della Organizzazione Mondiale della Salute (OMS) per determinare la probabilità che la reazione avversa fosse in realtà dovuta alla pianta *C. aurantium*. Il sistema OMS è stato sviluppato in collaborazione con altri centri che partecipano al programma di sorveglianza internazionale delle droghe ed è inteso come uno strumento pratico per la valutazione dei casi clinici. Si tratta essenzialmente di una valutazione combinata che tiene conto delle aspetti clinico-farmacologici, della storia del caso e la qualità della documentazione e della osservazione. L'OMS ha fornito un elenco di criteri di valutazione di causalità che sono definiti come segue: certo / probabile / possibile / improbabile / inaccessibile / inclassificabile (WHO, 2012).

B-Ricerca di ammine attive

4.1 TLC

4.1.1 Preparazione delle soluzioni standard

Si pesano 10 mg di ciascuna ammina standard e si sciolgono in 10 mL di metanolo, ottenendo una soluzione con concentrazione finale di 1 mg/mL.

4.1.2 Preparazioni dei campioni

Si prelevano casualmente 10 unità (capsule/comprese) di cui si polverizza il contenuto nel mortaio. Si miscela accuratamente il campione fino ad ottenere una polvere omogenea. Si pesa 1 g del campione che viene trasferito in un becker contenente metanolo (25 mL) e si agita con ancorotta magnetica per 30 minuti. Successivamente il campione viene filtrato su filtro di carta, ottenendo l'estratto in metanolo che viene concentrato a temperatura ambiente sotto flusso di azoto fino a ottenere un volume di 1 mL. Questo estratto viene caricato su TLC.

4.1.3 Modalità operative

a) Fase eluente

La separazione cromatografica mediante TLC di efedrina, sinefrina, norefedrina e octopamina viene effettuata utilizzando come fase mobile: cloroformio-metanolo-ammoniaca 32%, 75:23:2 (v/v/v).

La separazione di yohimbina prevede come fase mobile una miscela di cloroformio-metanolo-ammoniaca 32%, 90:4:6 (v/v/v).

La separazione cromatografica della vinpocetina ed evodiamina viene effettuata utilizzando come fase mobile: metanolo-ammoniaca 32%, 100:1.5 (v/v).

b) Rilevazione

Al termine della corsa cromatografica per la ricerca di efedrina, sinefrina, norefedrina, octopamina ed evodiamina la lastrina è rilevata alla luce UV (254 nm). La lastrina viene quindi

spruzzata con una soluzione alla Ninidrina in etanolo e mantenuta in stufa a 110°C fino a sviluppo della colorazione.

Per la ricerca di yohimbina e vinpocetina la rilevazione avviene alla luce UV (254 nm). Successivamente la lastrina viene spruzzata con il Reattivo di Dragendorff fino a sviluppo della colorazione.

4.1.4 Sensibilità dell'analisi con TLC

Il LOD è stato identificato caricando sulla lastrina quantitativi decrescenti di soluzioni standard di ammine (3 µg, 1 µg, 0.5 µg, 0.2 µg, 0.08 µg). Il limite di quantificazione è stato rilevato con l'utilizzo della luce UV a 254 nm e i reattivi alla Ninidrina o di Dragendorff.

4.2 PROCEDURE DI VALIDAZIONE DEL METODO IN HPLC

È stata svolta una completa convalida del metodo di quantificazione in HPLC per la sinefrina e octopamina in accordo alle guide linea della FDA relative alla convalida dei metodi bioanalitici [FDA, 2001].

4.2.1 Separazione ed idoneità del sistema HPLC

In questo studio si descrivono le prove eseguite al fine di modificare ed adattare il metodo ai nostri campioni. I parametri utilizzati per convalidare l'idoneità del sistema sono: tempo di ritenzione, fattore di ritenzione, fattore di separazione, fattore di simmetria e numero dei piatti teorici.

4.2.2 Limiti di Determinazione e Limiti di Quantificazione

Il limite di determinazione (LOD) indica la sensibilità del metodo e viene misurato per mezzo di iniezioni di un bianco di una matrice contenente estratti vegetali a cui vengono addizionati gli analiti di interesse. La concentrazione dell'analita nella matrice viene progressivamente diluita finché il picco osservato presenta un rapporto segnale-rumore di fondo di 3:1.

Il limite di quantificazione (LOQ) viene determinato come la più bassa concentrazione che può essere determinata con accettabile accuratezza e precisione. Devono essere rispettate le seguenti condizioni:

La risposta dell'analita al LOQ dovrebbe essere almeno 10 volte rispetto alla risposta del bianco. Il picco dell'analita (risposta) dovrebbe essere identificabile, distinto e riproducibile con una precisione uguale o inferiore a 20% e un'accuratezza del 80 - 120%.

4.2.3 Selettività

La selettività è la capacità di un metodo analitico di differenziare e quantificare l'analita in presenza di altri componenti nel campione. Un metodo iniziale per valutare la selettività si basa sul confronto tra diverse matrici (in questo caso integratori a base di estratti di piante prive delle sostanze di interesse).

Secondo le direttive della FDA, queste analisi devono essere condotte prendendo in esame un minimo di sei campioni bianchi. I bianchi sono valutati per l'assenza o presenza di picchi che coeluiscono con gli analiti di interesse. La selettività viene anche assicurata utilizzando i bianchi a cui vengono aggiunti gli analiti alla concentrazione corrispondente al limite più basso di quantificazione.

4.2.4 Accuratezza e Precisione

L'accuratezza di un metodo analitico descrive la vicinanza dei risultati medi ottenuti dal metodo rispetto alla concentrazione reale dell'analita.

L'accuratezza viene determinata attraverso le analisi replicate 5 volte di campioni contenenti quantità note di analiti (sinefrina e octopamina). È richiesto un minimo di tre concentrazioni all'interno dell'intervallo di concentrazioni previsto dalla retta di calibrazione (basso, medio, alto). Il valore medio non dovrebbe discostarsi dal valore reale per più del 15% ad eccezione del LOQ per il quale lo scostamento non deve superare il 20%. La deviazione del valore medio dal valore reale indica l'accuratezza del metodo (valore trovato/valore addizionato x 100).

La precisione di un metodo analitico descrive la vicinanza delle singole misure di un analita quando la procedura venga applicata ripetutamente con aliquote diverse allo stesso quantitativo di una matrice. La precisione deve essere misurata usando un minimo di cinque iniezioni per concentrazione. Vengono utilizzate tre concentrazioni diverse (bassa, media e alta) prese all'interno dell'intervallo di concentrazioni previsto dalla retta di calibrazione. La concentrazione

più bassa utilizzata è quella identificata come il LOQ del metodo. La precisione determinata a ogni livello di concentrazione deve avere un coefficiente di variazione (CV) non superiore al 15%, eccetto per il LOQ dove lo scostamento non deve superare il 20%. La precisione viene ulteriormente suddivisa in precisione within-day e between-day.

La precisione within-day è la dispersione di misure di un singolo campione ripetute nella stessa serie o seduta analitica (con gli stessi operatori, nelle stesse condizioni e durante la stessa giornata);

La precisione between-day esprime la possibilità che un operatore, alle prese con aliquote diverse di uno stesso campione, ottenga risultati più o meno dispersi seguendo la stessa procedura, con gli stessi strumenti ma in giorni diversi.

4.2.5 Recupero

Il recupero di un analita in un saggio è la risposta del rivelatore, ottenuta da una quantità di analita aggiunta ed estratta dalla matrice, rispetto alla risposta del rivelatore ottenuta per la stessa concentrazione dello standard puro.

Il recupero rappresenta l'efficienza di estrazione di un metodo analitico entro i limiti di variabilità, e deve essere coerente, preciso e riproducibile. Esperimenti di recupero vengono eseguiti confrontando i risultati analitici di campioni a tre concentrazioni diverse (bassa, media e alta) estratti in 3 repliche rispetto ai valori dello standard non estratto.

4.2.6 Linearità

La linearità di un metodo analitico è la sua idoneità a fornire risultati direttamente proporzionali alle concentrazioni degli analiti nei campioni, all'interno di un determinato campo di validità. Deve essere verificata attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione (R^2) ottenuto dalla retta di calibrazione.

La retta di calibrazione (estrapolata) ottenuta dall'estrazione degli standard dalla matrice, viene preparata con 7 punti, compreso un bianco ed un LOQ, nell'intervallo di applicabilità del metodo con 3 repliche per ogni concentrazione. Ad un bianco viene aggiunto lo standard a concentrazione nota. Successivamente, la matrice è sottoposta al metodo di estrazione descritto nella sezione Metodi, punto 4.3.2. Sono generalmente accettati coefficienti di correlazione uguali o superiore ai 0,98 [Moreau e Siqueira, 2008].

4.2.7 Stabilità degli analiti

Il processo di convalida della stabilità dell'octopamina e sinefrina è stato valutato a breve e a lungo termine. Inoltre, gli analiti sono stati testati in soluzione standard di HCl 0.1N e in campioni addizionati. I campioni sono stati preparati a due concentrazioni: 1 e 10 µg/mL, con 3 repliche per ogni concentrazione.

a) Stabilità in soluzioni standard in HCl 0.1N:

La stabilità a breve termine delle soluzioni di sinefrina e octopamina standard in HCl 0.1N viene determinata per analisi delle soluzioni conservate. Queste soluzioni sono tenute a temperatura ambiente per 8 ore e quindi iniettate in HPLC. L'area dei picchi ai vari tempi, viene confrontata con l'area degli stessi campioni ottenuta a tempo zero. Inoltre, la stabilità delle soluzioni standard è stata valutata a lungo termine dopo 1 mese di stoccaggio a -20°C.

b) Stabilità degli analiti in campioni addizionati:

La stabilità a breve termine viene determinata in un campione bianco a cui vengono aggiunti gli analiti. Questi campioni, dopo essere stati preparati, rimangono a temperatura ambiente per 8 ore e quindi vengono iniettati in HPLC.

La stabilità a lungo termine viene determinata analizzando i campioni conservati a temperatura di -20°C per un mese, e i campioni mantenuti alla stessa temperatura ma sottoposti a tre cicli di congelamento/scongelo.

L'area dei picchi di ciascun analita, viene confrontata con l'area degli stessi al tempo zero.

4.3 HPLC

4.3.1 Preparazione delle soluzioni standard

Si pesano esattamente 10 mg di standard e si sciolgono in 10 mL di 0.1 N HCl, ottenendo soluzioni con concentrazione finale di 1.0 mg/mL.

4.3.2 Preparazione del campione

a) Ricerca di sinefrina ed octopamina

Si pesa 0.5 g di campione (polvere omogenea, preparata come descritto per l'analisi in TLC) che viene sospeso in 50 mL di HCl 0.1 N; la sospensione viene mantenuta sotto agitazione per 10

minuti e quindi filtrata su filtro da 0.45 micron. La soluzione così ottenuta viene iniettata in HPLC (100 µL).

b) Ricerca di efedrina

La preparazione del campione per l'analisi in HPLC dell'efedrina e norefedrina viene effettuata secondo il metodo descritto da Roman et al. (2004) e prevede le seguenti fasi successive:

- 1) Si pesano 3 g di campione omogeneizzato in un matraccio da 100 mL, si aggiungono 50 mL di soluzione diluente e si agita meccanicamente per 15 minuti;
- 2) Si sonica per 45 minuti, quindi si lascia a riposo la soluzione fino a raggiungimento della temperatura ambiente;
- 3) Si porta a volume di 100 mL con la soluzione diluente;
- 4) Si lascia riposare la soluzione e si preleva il surnatante;
- 5) Si carica su SPE Strata SCX Cartridge.

Il protocollo di eluizione su SPE prevede i seguenti passaggi:

- 1) Condizionare la cartuccia eluendo in successione con 2 mL di metanolo e 1 mL di H_3PO_4 50 mM, facendo attenzione a non andare a secco;
- 2) Caricare in testa alla cartuccia 5 mL del campione preparato come descritto precedentemente ed eluire con un flusso < 2 mL/min;
- 3) Portare a secco;
- 4) Lavare la cartuccia, eluendo con 1 mL della soluzione H_3PO_4 50 mM; portare a secco la SPE ed eliminare l'eluato;
- 5) Eluire con 2 mL di metanolo, portare a secco la SPE ed eliminare l'eluato;
- 6) Posizionare sotto la cartuccia un matraccio da 10 mL, eluire con 1 mL della soluzione eluente per SPE e raccogliere l'eluato;
- 7) Ripetere l'operazione 3 volte;
- 8) Aggiungere nel matraccio 5 mL di soluzione di H_3PO_4 500 mM e attendere che la soluzione si raffreddi a temperatura ambiente;
- 9) Portare a volume di 10 mL con la soluzione di H_3PO_4 500 mM;
- 10) Si inietta il campione in HPLC (100 µL).

4.3.3 Modalità operative

a) Ricerca di sinefrina ed octopamina

L'octopamina e la sinefrina vengono analizzate secondo il metodo modificato di Putzbach et al. (2007).

Fase mobile: L'eluizione viene effettuata in gradiente nelle condizioni riportate in **Tabella 2**.

Tabella 2 – Gradiente di eluizione utilizzato in HPLC

Tempo (minuti)	% Fase A	% Fase B
0	85	15
5	85	15
35	10	90
43	10	90
44	85	15

in cui:

- Fase A - Soluzione acquosa di sodio dodecil solfato 0.288 g/L, portata a pH 3 con acido orto-fosforico 85%.
- Fase B - Soluzione acquosa di sodio dodecil solfato 0.288 g/L: acetonitrile (50:50, v/v), portata a pH 3 con acido orto-fosforico 85%.

Le soluzioni vengono degasate con bagno ad ultrasuoni.

Altri parametri:

- Colonna LiChrospher RP-18, 250 x 4 mm ID, diametro medio delle particelle 5 µm, mantenuta a 24°C
- Pre-colonna LiChrospher 100 RP-18, diametro medio delle particelle 5 µm
- Flusso: 1 mL/min
- Rivelatore fluorimetrico: 270 / 305 nm (Eccitazione/Emissione)

b) Ricerca di efedrina e norefedrina:

L'analisi in HPLC dell'efedrina viene svolta secondo il metodo descritto da Roman et al. 2004.

Fase mobile: L'eluizione viene effettuata in gradiente nelle condizioni riportate in **Tabella 3**.

Tabella 3 – Gradiente di eluizione utilizzato
in HPLC

Tempo (minuti)	% Fase A	% Fase B
0	85	15
5	85	15
35	10	90
43	10	90
44	85	15

in cui:

- Fase A - soluzione acquosa (NaC_8SO_3 10 mM) portata a pH 3 con H_3PO_4 .
- Fase B - soluzione acquosa NaC_8SO_3 10 mM: acetonitrile (50:50, v/v) portata a pH 3 con H_3PO_4 .

Le soluzioni vengono degasate con bagno ad ultrasuoni.

Altri parametri:

- Colonna Reprospher C-8-Aqua, 250 mm x 4.6 mm, diametro medio delle particelle 5 μm , mantenuta a 24°C
- Flusso: 1 mL /min
- Rivelatore UV alla lunghezza d'onda di 210 nm

4.4 LC-MS

4.4.1 Preparazione delle soluzioni standard

Si pesano esattamente 10 mg di standard e si sciolgono in 10 mL di HCl 0.1 N, ottenendo una soluzione alla concentrazione finale di 1.0 mg/mL.

4.4.2 Preparazione del campione

Si pesa 0.5 g di campione (polvere omogenea, preparata come descritto per l'analisi in TLC) che viene sospeso in 50 mL HCl 0.1 N; la sospensione è stata mantenuta in agitazione per 10 minuti e

quindi filtrata su filtro da 0.45 micron. La soluzione così ottenuta viene iniettata in LC/MS (20 µL).

4.4.3 Modalità operative

- Tecnica utilizzata: ESI-IT-MS_n (ESI-ion trap multistage tandem mass spectrometry)
- Sorgente: electrospray a ionizzazione positiva (ESI+), con azoto come gas sheath, ausiliario e sweep a flusso 23, 8 e 2 (unità arbitrarie) rispettivamente
- Temperatura di vaporizzazione: 450 °C
- Energia di collisione (SID) 20V
- Temperatura del capillare 275°C
- Strumento programmato per operare in MS² e MS³
- Gas di collisione: elio mantenuto a 24°C

Fase mobile: Il gradiente di eluizione viene descritto dalla **Tabella 4**.

Tabella 4 – Gradiente di eluizione utilizzato in HPLC

Tempo (minuti)	% Fase A	% Fase B
0	90	10
13	0	100
14	90	10

in cui:

- Fase A - acido formico 0.1%
- Fase B - metanolo

Altri parametri:

- Colonna ODS2 2.1 x 150 mm, diametro medio delle particelle 5 µm, mantenuta a 24°C
- Flusso: 0.2 mL/min

C-Ricerca di ormoni steroidei

4.5 TLC

4.5.1 Preparazione delle soluzioni standard

Si pesano 10 mg di ciascun ormone steroideo (standard) e si sciolgono in 10 mL di metanolo, ottenendo una soluzione con concentrazione finale di 1 mg/mL.

4.5.2 Preparazioni dei campioni

Si prelevano casualmente 10 unità (capsule/comprese) di cui si polverizza il contenuto nel mortaio. Si miscela accuratamente il campione fino ad ottenere una polvere omogenea. Si pesa 1 g del campione che viene trasferito in un becker contenente metanolo (25 mL) e si agita con ancorotta magnetica per 30 minuti. Successivamente il campione viene filtrato su filtro di carta, ottenendo l'estratto in metanolo che viene concentrato a temperatura ambiente sotto flusso di azoto fino a ottenere un volume di 1 mL. Questo estratto viene caricato su TLC.

4.5.3 Modalità operative per TLC

a) Fase eluente

La separazione cromatografica mediante TLC viene effettuata utilizzando come fase mobile una miscela di cloroformio-acetone , 85:15 (v/v).

b) Rilevazione

Al termine della corsa cromatografica, la lastrina viene spruzzata con una soluzione 5% di acido solforico in etanolo. La lastrina viene lasciata ad asciugare per 15 minuti e messa in stufa a 110°C fino a sviluppo della colorazione. La lastrina viene anche rilevata alla luce UV (254nm) e alla luce UV (365 nm) dopo reazione con acido solforico.

4.5.4 Sensibilità dell'analisi con TLC

Il LOD è stato identificato, caricando sulla lastrina quantitativi decrescenti di soluzioni standard di ogni steroide (500 ng, 250 ng, 125 ng, 62.5 ng, 31.2 ng, 15.6 ng, 7.8 ng, 3.9 ng). Il limite di quantificazione è stato rilevato con l'utilizzo della luce UV a 254 e 365 nm e reattivo all'acido solforico.

4.6 MESSA A PUNTO DEL METODO IN LC-MS E PROCEDURE DI VALIDAZIONE

È stata svolta una completa convalida del metodo di quantificazioni in LC-MS per gli ormoni in accordo alle guide linea della FDA relative alla convalida dei metodi bioanalitici - FDA Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation [FDA, 2001].

4.6.1 Separazione ed idoneità del sistema HPLC

In questo studio si descrivono le prove eseguite al fine di modificare ed adattare il metodo ai nostri campioni. I parametri utilizzati per convalidare l'idoneità del sistema sono: tempo di ritenzione, fattore di ritenzione, fattore di separazione, fattore di simmetria e numero dei piatti teorici.

4.6.2 Limiti di Determinazione e Limiti di Quantificazione

Il limite di determinazione (LOD) indica la sensibilità del metodo e viene misurato per mezzo di iniezioni di un bianco di una matrice contenente estratti vegetali a cui vengono addizionati gli analiti di interesse. La concentrazione dell'analita nella matrice viene progressivamente diluita finché il picco osservato presenta un rapporto segnale-rumore di fondo di 3:1.

Il limite di quantificazione (LOQ) viene determinato come la più bassa concentrazione che può essere determinata con accettabile accuratezza e precisione. Devono essere rispettate le seguenti condizioni:

La risposta dell'analita al LOQ dovrebbe essere almeno 10 volte rispetto alla risposta del bianco. Il picco dell'analita (risposta) dovrebbe essere identificabile, distinto e riproducibile con una precisione uguale o inferiore a 20% e un accuratezza del 80-120%.

4.6.3 Selettività

La selettività è la capacità di un metodo analitico di differenziare e quantificare l'analita in presenza di altri componenti nel campione. Un metodo iniziale per valutare la selettività si basa sul confronto tra diverse matrici non contaminate (in questo caso integratori a base di estratti di piante prive delle sostanze di interesse).

Secondo le direttive della FDA, queste analisi devono essere condotte prendendo in esame un minimo di sei campioni bianchi. I bianchi sono valutati per l'assenza o presenza di picchi che coeluiscono con gli analiti di interesse. La selettività viene anche assicurata utilizzando i bianchi a cui vengono aggiunti gli analiti alla concentrazione corrispondente al limite più basso di quantificazione.

4.6.4 Accuratezza e Precisione

L'accuratezza di un metodo analitico descrive la vicinanza dei risultati medi ottenuti dal metodo rispetto alla concentrazione reale dell'analita.

L'accuratezza viene determinata attraverso le analisi replicate 5 volte di campioni contenenti quantità note di analiti. È richiesto un minimo di tre concentrazioni all'interno dell'intervallo di concentrazioni previsto dalla retta di calibrazione (basso, medio, alto). Il valore medio non dovrebbe discostarsi dal valore reale per più del 15% ad eccezione del LOQ per il quale lo scostamento non deve superare il 20%. La deviazione del valore medio dal valore reale indica l'accuratezza del metodo (valore trovato/valore addizionato x 100).

La precisione di un metodo analitico descrive la vicinanza delle singole misure di un analita quando la procedura venga applicata ripetutamente con aliquote diverse allo stesso quantitativo di una matrice. La precisione deve essere misurata usando un minimo di cinque iniezioni per concentrazione. Vengono utilizzate tre concentrazioni diverse (bassa, media e alta) prese all'interno dell'intervallo di concentrazioni previsto dalla retta di calibrazione. La concentrazione più bassa utilizzata è quella identificata come il LOQ del metodo. La precisione determinata a ogni livello di concentrazione deve avere un coefficiente di variazione (CV) non superiore al 15%, eccetto per il LOQ dove lo scostamento non deve superare il 20%. La precisione viene ulteriormente suddivisa in precisione within-day e between-day.

La precisione within-day è la dispersione di misure di un singolo campione ripetute nella stessa serie o seduta analitica (con gli stessi operatori, nelle stesse condizioni e durante la stessa giornata). La precisione between-day esprime la possibilità che un operatore, alle prese con

aliquote diverse di uno stesso campione, ottenga risultati più o meno dispersi seguendo la stessa procedura, con gli stessi strumenti ma in giorni diversi.

4.6.5 Recupero

Il recupero di un analita in un saggio è la risposta del rivelatore, ottenuta da una quantità di analita aggiunta ed estratta dalla matrice, rispetto alla risposta del rivelatore ottenuta per la stessa concentrazione dello standard puro.

Il recupero rappresenta l'efficienza di estrazione di un metodo analitico entro i limiti di variabilità, e deve essere coerente, preciso e riproducibile. Esperimenti di recupero vengono eseguiti confrontando i risultati analitici di campioni a tre concentrazioni diverse (bassa, media e alta) estratti in 3 repliche rispetto ai valori dello standard non estratto.

4.6.6 Linearità

La linearità di un metodo analitico è la sua idoneità a fornire risultati direttamente proporzionali alle concentrazioni degli analiti nei campioni, all'interno di un determinato campo di validità. Deve essere verificata attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione (R^2) ottenuto dalla retta di calibrazione.

La retta di calibrazione (estrapolata) ottenuta dall'estrazione degli standard dalla matrice, viene preparata con 7 punti, compreso un bianco ed un LOQ, nell'intervallo di applicabilità del metodo con 3 repliche per ogni concentrazione. Ad un bianco viene aggiunto lo standard a concentrazione nota. Successivamente, la matrice è sottoposta al metodo di estrazione descritto nella sezione Metodi, punto 4.7.3 Sono generalmente accettati coefficienti di correlazione uguali o superiore ai 0.98 [Moreau e Siqueira, 2008].

Per la quantificazione degli analiti nei campioni, si utilizza il rapporto tra le concentrazioni dello standard dell'analita ricercato e la concentrazione dello standard interno in ordinata e il rapporto delle aree relative in ascissa.

4.6.7 Stabilità degli analiti

Il processo di convalida della stabilità dell'octopamina e sinefrina è stato valutato a breve e a lungo termine. Inoltre, gli analiti sono stati testati in soluzione standard di HCl 0.1N e in

campioni addizionati. I campioni sono stati preparati a due concentrazioni: 1 e 10 µg/mL, con 3 repliche per ogni concentrazione.

a) Stabilità in soluzioni standard in HCl 0.1N:

La stabilità a breve termine delle soluzioni di sinefrina e octopamina standard in HCl 0.1N viene determinata per analisi delle soluzioni conservate. Queste soluzioni sono tenute a temperatura ambiente per 8 ore e quindi iniettate in HPLC. L'area dei picchi ai vari tempi, viene confrontata con l'area degli stessi campioni ottenuta a tempo zero. Inoltre, la stabilità delle soluzioni standard è stata valutata a lungo termine dopo 1 mese di stoccaggio a -20°C.

b) Stabilità degli analiti in campioni addizionati:

La stabilità a breve termine viene determinata in un campione bianco a cui vengono aggiunti gli analiti. Questi campioni, dopo essere stati preparati, rimangono a temperatura ambiente per 8 ore e quindi vengono iniettati in HPLC.

La stabilità a lungo termine viene determinata analizzando i campioni conservati a temperatura di -20°C per un mese, e i campioni mantenuti alla stessa temperatura ma sottoposti a tre cicli di congelamento/scongelamento.

L'area dei picchi di ciascun analita, viene confrontata con l'area degli stessi al tempo zero.

4.7 LC-MS

4.7.1 Preparazione delle soluzioni standard

Si pesano 10 mg di ciascun ormone steroideo (standard) e si sciolgono in 10 mL di metanolo-acqua 1:1 (v/v), ottenendo una soluzione a concentrazione finale di 1 mg/mL.

4.7.2 Preparazione degli standard interni (IS)

Si pesano esattamente 10 mg di standard di estradiolo o progesterone e si disciolgono in metanolo, per ottenere una soluzione a concentrazione finale di 1.0 mg/mL.

4.7.3 Preparazione dei campioni

a) Uso delle cartucce SPE

La preparazione del campione prevede le seguenti fasi:

- 1) Si preleva 1 mg di campione in polvere e si trasferisce in una eppendorf; si aggiunge 1 µg degli standard interni (progesterone ed estradiolo) sciolti in metanolo.
- 2) Dopo aver portato a secco con azoto, al residuo si aggiunge 1 mL di etanolo;
- 3) Si agita con vortex per 15 secondi e si sonica per 5 minuti;
- 4) Si centrifuga il campione a 12000 giri per 5 minuti;
- 5) Si preleva il surnatante. L'operazione viene ripetuta per 2 volte.
- 6) Si carica su colonnina SPE.

Il protocollo di eluizione su SPE prevede i seguenti passaggi:

- 1) Condizionare la cartuccia eluendo in successione 2 mL di metanolo e 2 mL di metanolo-acqua 10:90 (v/v). Caricare lentamente in testa alla cartuccia il campione preparato come descritto precedentemente, senza utilizzare il vuoto;
- 2) Si procede con il lavaggio caricando 1.5 mL di metanolo-acqua, 50:50 (v/v);
- 3) Si caricano 2 mL di metanolo, prelevando l'eluato che viene ulteriormente portato a secco;
- 4) Si risospende il campione in 1 mL di metanolo-acqua, 50:50 (v/v);
- 5) Una quantità di 0.2 mL viene trasferita in vial da autocampionatore, di cui 25 µL vengono iniettati per l'analisi.

b) Estrazione in etanolo

Si pesa 1 mg di campione (polvere omogenea, preparata come descritto per l'analisi in TLC) e si aggiunge 1 µg degli standard interni (progesterone ed estradiolo). Dopo aver portato a secco con azoto, al residuo si aggiungono 1.5 mL di etanolo. La soluzione viene agitata su vortex per 10 secondi e quindi centrifugata a 12000 rpm per 5 minuti. L'operazione viene ripetuta per 2 volte. Il surnatante ottenuto viene trasferito in provetta e portato a secco sotto flusso di azoto. Il residuo viene disciolto in 1 mL di metanolo/acqua, 50:50. Una quantità di 0.2 mL viene trasferita in vial da autocampionatore, di cui 25 µL vengono iniettati per l'analisi.

4.7.4 Modalità operative

La sorgente utilizzata nello spettrometro è un elettrospray a ionizzazione positiva (ESI+), con azoto come gas sheath, ausiliario e sweep a flusso 15, 10 e 10 (unità arbitrarie) rispettivamente. Lo strumento è stato programmato per operare in MS² con elio come gas di collisione. I parametri relativi agli analiti sono stati studiati e scelti come descritto in **Tabella 5** e ottenuti

utilizzando wide band activation. Mentre le analisi sono state condotte con il gradiente descritto in **Tabella 6**.

Tabella 5 – Parametri per l'analisi in MS degli analiti ricercati

Analita	ione molecolare (M+)	Energia di collisione (%)	Transizione m/z
Androstenedione	287	40	97;251;211;109;185
Metandrostenolone	301	35	149;173;121;187
Nandrolone	275	35	239;257;199;145
Stanozololo	329	58	121;229;203;147;189
Testosterone	289	35	253;97;109;271
Testosterone Enantato	401	35	271;253;255;289;365

Tabella 6 – Gradiente di eluizione utilizzato in LC

Tempo (minuti)	% Fase A	% Fase B
0	70	30
1.5	70	30
10	36	64
20	1	99
25	1	99
25.1	70	30
40	70	30

In cui:

- Fase A - 0.1% acido formico in acqua
- Fase B - 0.1% acido formico in metanolo

Altri parametri:

- Colonna: Hypersil GOLD aQ 2.1x100 mm, particle size 3 mm, mantenuta a 24°C
- Flusso: 0.25 mL/min

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

A-Ricerca sistematica

5.1 EFFETTI AVVERSI DESCRITTI

Nella **Tabella 7** vengono descritti gli articoli scientifici trovati in letteratura che riportano eventi avversi a seguito dell'assunzione di integratori alimentari contenenti la pianta *C. aurantium*. Vengono illustrati i principali effetti registrati, la parte della pianta utilizzata ed il tipo di preparazione. Inoltre, la probabilità che un effetto avverso fosse correlato realmente all'utilizzo del *C. aurantium* è stata determinata, quando non specificata nell'articolo, utilizzando la Linea Guida di Farmacovigilanza dell'Organizzazione Mondiale della Salute [WHO, 2012].

Tabella 7 – Eventi avversi dovuti alla ingestione di integratori alimentari contenenti *C. aurantium*

Effetto	Parte della pianta	Tipo di preparazione	Riferimenti
Casualità: Certa			
Aumento della pressione arteriosa e frequenza cardiaca	Frutto	Estratto non specificato	Bui et al., 2006
Casualità: Probabile			
Tachicardia e dispnea	Non specificato	Estratto non specificato	Marles, 2011
Casualità: Possibile			
Colite ischemica	Frutto	Estratto non specificato	Sultan et al., 2006
Ipertensione	Non specificato	Estratto non specificato	Vitalone et al., 2011
Palpitazioni, extrasistole ventricolare	Non specificato	Estratto non specificato	Vitalone et al., 2011
Epatite con insufficienza epatica massiva e necrosi	Non specificato	Estratto non specificato	Vitalone et al., 2011

Tabella 7 - *Continuazione* - Eventi avversi dovuti alla ingestione di integratori alimentari contenenti *C. aurantium*

Casualità: Inclassificabile			
Fototossicità	Non specificato	Estratto non specificato	Fraunfelder, 2004
Mal di testa, aumento della pressione arteriosa e frequenza cardiaca	Foglie	Decotto	Chan et al., 2005

5.2 EFFETTI AVVERSI DOVUTI A ERRORI DI IDENTIFICAZIONE

Non sono stati descritti in letteratura casi di eventi avversi dovuti a errori di identificazione della pianta.

5.3 EFFETTI AVVERSI DOVUTI AD INTERAZIONI CON NUTRIENTI O FARMACI

L'associazione farmaco-integratore alimentare può determinare un miglioramento dello stato di salute del consumatore ma talora l'interazione delle due sostanze può rivelarsi pericolosa, sviluppando reazioni avverse dovute all'aumento della tossicità del farmaco associato.

Nella **Tabella 8** vengono descritti gli articoli scientifici trovati in letteratura che riguardano interazioni di integratori alimentari contenenti *C. aurantium* con alimenti o farmaci. Vengono riportati i principali effetti registrati, la parte della pianta utilizzata, il tipo di preparazione ed il composto sospetto di interagire con l'integratore. Inoltre, la probabilità che l'effetto avverso sia correlato realmente all'utilizzo del *C. aurantium* è stata determinata, quando non specificata nell'articolo, utilizzando la Linea Guida della Farmacovigilanza dell'Organizzazione Mondiale della Salute [WHO, 2012].

Tabella 8 – Eventi avversi dovuti alla interazione della pianta *C. aurantium* con nutrienti o farmaci

Effetto	Parte della pianta	Tipo di preparazione	Interazione con	Riferimenti
Casualità: Certa				
Effetti stimolanti cardiovascolari	Frutto acerbo	Estratto non specificato	Caffeina	Haller et al., 2005
Aumento pressione arteriosa sistolica	Frutto	Estratto non specificato	Caffeina	Hoffman et al., 2006 Haller et al., 2008
Inattivazione del CYP3A4 intestinale	Frutto	Succo	Felodipina	Malhotra et al., 2001
Casualità: Probabile				
Fibrillazione ventricolare	Frutto	Estratto non specificato	Caffeina	Stephensen and Sarlay, 2009
Tachicardia	Frutto acerbo	Estratto non specificato	Tiroxina	Firenzuoli et al., 2005
Vomito e nausea	Non specificato	Estratto non specificato	Caffeina, Yohimbina e Tirosina	Vitalone et al., 2011
Casualità: Possibile				
Colite ischemica	Frutto acerbo	Estratto non specificato	Efedrina e Caffeina	Ryan et al., 2002
Sincope indotta dall'esercizio con prolungamento del QT	Frutto acerbo	Estratto non specificato	Caffeina	Nasir et al., 2004
Infarto miocardico acuto	Frutto	Estratto non specificato	Caffeina	Nykamp et al., 2004
Ictus ischemico	Frutto	Estratto non specificato	Caffeina	Bouchard et al., 2005
Mascheramenti di effetti ipotensivi	Scorza del frutto	Estratto non specificato	Caffeina	Gray and Woolf, 2005
Variante di angina	Scorza del frutto	Estratto non specificato	Caffeina	Gange et al., 2006
Rabdomiolisi	Frutto	Estratto non specificato	Caffeina e Yohimbina	Burke et al., 2007
Vasospasmo ed ictus	Frutto	Estratto non specificato	Caffeina	Holmes and Tavee, 2008

Tabella 8 - Continuazione - Eventi avversi dovuti alla interazione della pianta *C. aurantium* con nutrienti o farmaci

Effetto	Parte della pianta	Tipo di preparazione	Interazione con	Riferimenti
Casualità: Possibile				
Infarto del miocardio	Frutto	Estratto non specificato	Yohimbina e Feniletilamina	Thomas et al., 2009
Intenso prurito nel palmo delle mani	Non specificato	Estratto non specificato	Caffeina, Acido acetil salicilico	Vitalone et al., 2011
35 reazioni cardiovascolari, 1 allergia, 1 rabdomiolisi, 1 apoplezia e 1 aumento della funzione epatica, 9 non specificati = 48 casi "principalmente classificati come possibile"	Non specificato	Estratto non specificato	Caffeina e/o Efedrina	Marles, 2011
Psicosi, tachicardia e ipertensione	Scorza del frutto	Estratto non specificato	Levotiroxina e Caffeina	Retamero et al., 2011
Casualità: Inclassificabile				
Ansia, mal di testa, palpitazioni, angina, nefrite interstiziale, crampi muscolari, diarrea, rigidità del collo, ecc (20 casi)	Non specificato	Estratto non specificato	Caffeina o Tiroxina o Efedrina	Stohs, 2010
Disidratazione della pelle, depressione	Non specificato	Estratto non specificato	Caffeina e Levotiroxina	Vitalone et al., 2011

5.4 BIOMARKERS

✓ Molecole associate con gli eventi avversi
Sinefrina ed altri proto-alcaloidi come la octopamina, tiramina, ordenina e N-metiltiramina.

5.5 DISCUSSIONE

La letteratura scientifica riporta un totale di 18 articoli che descrivono eventi avversi a seguito dell'assunzione di prodotti contenenti *C. aurantium*. I casi descritti riguardano 90 pazienti. Le donne costituiscono il 43% dei consumatori mentre gli uomini il 21% e per il resto dei casi non è stato riportato il sesso. Molti di questi casi riportano effetti collaterali sul sistema cardiovascolare, come: infarto miocardico [Nykamp, et al., 2004; Thomas et al., 2009], tachicardia [Firenzuoli et al., 2005], sincope [Nasir et al., 2004], attacco ischemico [Bouchard et al., 2005; Holmes e Tavee, 2008], fibrillazione ventricolare [Stephensen et al., 2009] e angina di Prinzmetal [Gange et al., 2006]. Le formulazioni utilizzate erano compresse e capsule, assunte per via orale principalmente per favorire la perdita di peso. Solo in una piccola percentuale dei casi riportati, il *C. aurantium* rappresenta l'unico costituente dell'integratore alimentare (**Figura 16**).

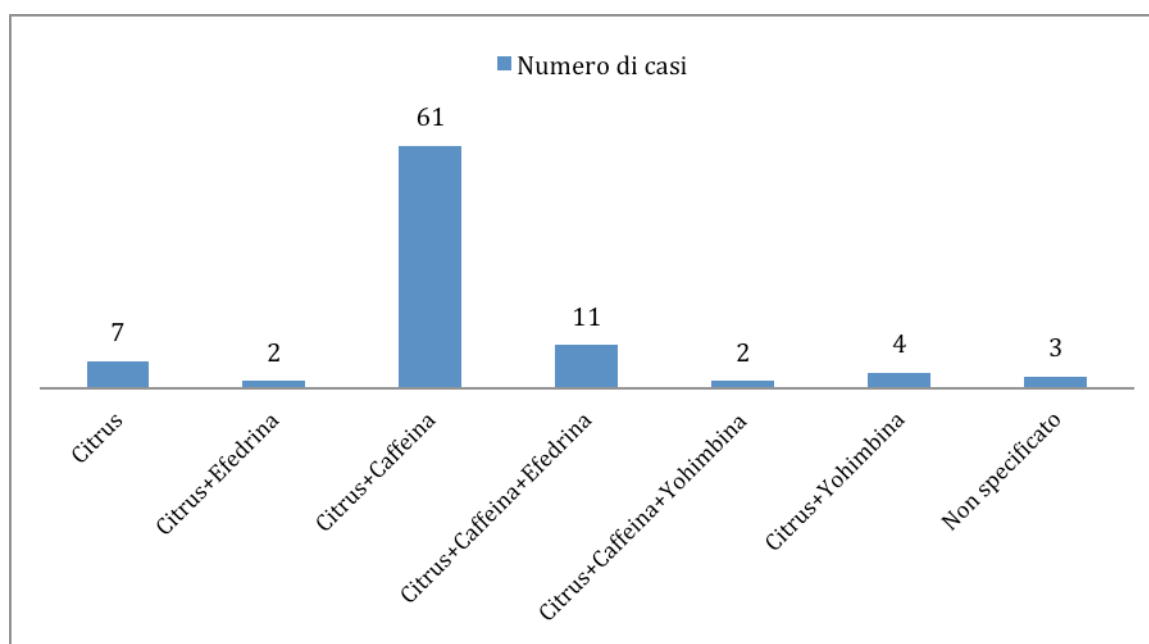


Figura 16 - Molecole con attività stimolanti presenti nei prodotti responsabili di eventi avversi

Nella maggior parte dei casi l'associazione è stata classificata come "possibile" e non "probabile" o "certa" a causa di vari fattori: la presenza di altri stimolanti nel prodotto; possibili adulterazioni, l'obesità, trattamento concomitante per l'ipotiroidismo, l'asma, il diabete, l'ipertensione, l'iperlipidemia, l'alcolismo, l'abuso di sostanze stupefacenti, il trattamento con farmaci antidepressivi, l'ansia, il tabagismo, ed altri. Questi fattori riguardano sia abitudini personali, sia patologie del sistema cardiovascolare che rendono i soggetti notoriamente più sensibili all'azione delle sostanze stimolanti.

5.5.1 Effetti stimolanti

Come riportato precedentemente, i principali componenti presenti negli estratti di *Citrus aurantium* sono la p-sinefrina e l'octopamina. Queste due sostanze sono in grado di stimolare il sistema nervoso simpatico dando luogo alla caratteristica risposta del "combatti o fuggi" (fight or flight). Sia la sinefrina che l'octopamina endogena, sembrano essere coinvolte nella fisiopatologia dell'emicrania [D'Andrea et al., 2003]. A livello periferico la sinefrina, attraverso la stimolazione dei recettori α -1 adrenergici, produce vasocostrizione ed incremento della pressione sanguigna [Hoffman e Taylor, 2001; Penzak et al., 2001].

Inoltre, il meccanismo ergogenico degli agenti simpaticomimetici come la sinefrina, include un aumento della frequenza cardiaca e del dispendio energetico attraverso stimolazione a livello centrale. I consumatori possono riscontrare effetti cardiaci gravi a causa dell'aumento del post-carico e del ritmo cardiaco, i quali possono portare a una maggiore richiesta di ossigeno da parte del miocardio, una diminuzione nel riempimento diastolico e un'insufficienza nel fornire ossigeno ai cardiomiociti.

5.5.2 Interazioni con farmaci metabolizzati dal CYP3A4

Il CYP3A4 è un isoenzima del complesso enzimatico del citocromo P450, che è responsabile del metabolismo della maggior parte dei farmaci. Il CYP3A4 è l'enzima predominante nella parete intestinale e nel fegato. L'assunzione contemporanea di un integratore contenente un inibitore dell'enzima e di un farmaco metabolizzato da questo enzima potrebbe causare importanti interazioni, aumentando i livelli plasmatici del farmaco assunto e quindi rendendolo più attivo e in alcuni casi tossico. Il succo di *Citrus aurantium* contiene due flavonoidi attivi verso questo enzima: la 6',7'-diidrossibergamottina, un bloccante selettivo del CYP3A4 e la bergaptina, una furanocumarina che, anche se in modo meno marcato, comunque inibisce lo stesso isoenzima [Fugh-Bergman e Myers, 2004].

Per dimostrare una possibile interazione tra il *Citrus aurantium* e il CYP3A4, sono stati effettuati diversi studi clinici. In uno di questi [Edwards et al., 1999] è stata riscontrata una chiara diminuzione della funzionalità dell'isoenzima CYP3A4 dopo l'ingestione del succo di arancio amaro. Un secondo studio [Malhotra et al., 2001] riguarda l'interazione tra il succo di arancio amaro o succo di pompelmo e il metabolismo della felodipina, un farmaco metabolizzato dal CYP3A4. Il bloccante selettivo del CYP3A4, la 6',7'-diidrossibergamottina, è contenuto anche nel

succo di pompelmo. Gli autori hanno concluso che entrambi i succhi inibiscono anche se in percentuali diverse il CYP3A4, visto che l'area sotto la curva della concentrazione massima della felodipina nel plasma (C_{max}) è risultata aumentata del 76% nel caso dell'arancio amaro e del 90% per il succo di pompelmo.

Al contrario, Gurley et al. (2004) hanno evidenziato che una somministrazione di estratto di arancio amaro per 28 giorni, non ha provocato alcuna interazione con il CYP3A4. In realtà, tramite analisi cromatografica ad alte prestazioni (HPLC), si è riscontrata un'assenza della 6',7'-diidrossibergamottina nell'estratto di scorza di frutto utilizzato. Questo potrebbe essere determinato dal metodo di estrazione e cioè l'utilizzo di acqua calda. Data la scarsa solubilità della 6',7'-diidrossibergamottina e in genere delle furanocumarine in acqua, è normale che queste sostanze non siano presenti negli integratori alimentari che sono costituiti dall'estratto secco. Può non essere appropriato dunque, mettere a confronto il consumo del succo con quello di un integratore alimentare contenente l'estratto di arancio amaro e non è possibile affermare che l'assunzione di un integratore contenente estratto di *Citrus aurantium* interferisca con il metabolismo dei farmaci.

5.5.3 Interazioni con farmaci antidepressivi

Questo tipo di interazione riguarda i farmaci inibitori delle monoamino ossidasi (IMAO) e gli antidepressivi triciclici. L'effetto principale degli inibitori delle monoamino ossidasi (IMAO) consiste nell'aumentare la concentrazione citoplasmatica delle ammine nelle terminazioni nervose, senza influenzare in modo significativo l'accumulo vescicolare che determina la quantità di trasmettitore rilasciabile dalla stimolazione nervosa. L'uso concomitante della sinefrina e di altre ammine simpatico mimetiche, come la tiramina e degli IMAO può portare a crisi ipertensive. L'inibizione delle MAO determina una maggiore concentrazione della tiramina nello spazio intersinaptico, che normalmente viene metabolizzata da questi enzimi. Si possono verificare, quindi, effetti cardiovascolari gravi come una crisi ipertensiva, dovuto all'aumento dell'azione simpaticomimetica da parte della tiramina e delle altre ammine simpaticomimetiche [Rang et al., 2004]. La sinefrina, così come la tiramina e l'octopamina, sono substrati delle MAO [Suzuki et al., 1979]. Si potrebbe, quindi, supporre un'interazione tra la sinefrina e gli inibitori delle monoammino ossidasi, che può portare all'ipertensione grave [Rang et al., 2004]. Le interazioni sono molto probabili anche con gli antidepressivi triciclici, dato che queste molecole agiscono principalmente bloccando la ricaptazione delle ammine dalle terminazioni nervose, probabilmente a causa della competizione per il trasportatore di queste molecole all'interno

della membrana cellulare [Rang et al., 2004]. L'inibizione della ricaptazione di queste molecole provoca un aumento delle loro concentrazioni e un potenziamento della loro attività. Molto probabilmente, gli antidepressivi triciclici potrebbero interferire allo stesso modo con le ammine contenute nel *C. aurantium*, vista la loro similitudine strutturale alle ammine endogene [Sweetman, 2007].

5.5.4 Interazioni con ormoni tiroidei

Concentrazioni elevate di ormoni tiroidei possono anche aumentare la sensibilità dei recettori adrenergici [Sweetman, 2007]. Uno studio di Williams et al. (1976) ha dimostrato che gli ormoni tiroidei possono influenzare il numero dei recettori β -adrenergici del cuore. L'aumento nel numero di questi recettori potrebbe essere responsabile, almeno in parte, della sensibilità aumentata di questi recettori alle catecolamine nei soggetti affetti da ipertiroidismo. I soggetti affetti da questa patologia ed i soggetti affetti da ipotiroidismo e in terapia con medicinali contenenti ormoni tiroidei, potrebbero essere più sensibili all'azione della sinefrina ed andare incontro all'insorgenza di effetti avversi cardiovascolari.

5.5.5 Interazioni con la caffeina

La caffeina aumenta la concentrazione di cAMP attraverso il blocco dell'enzima catabolizzante le fosfodiesterasi, aumentando così gli effetti dei neurotrasmettitori catecolaminergici. Un'altra modalità d'azione riguarda l'interazione con i recettori dell'adenosina, un neurotrasmettitore purinergico strutturalmente simile alla caffeina [Katzung, 2001]. La caffeina è un antagonista non selettivo dei recettori adenosinici e l'inibizione dell'attività presinaptica dell'adenosina potrebbe indurre un rilascio delle catecolamine e conseguente contrazione e attivazione del nodo senoatriale e atrio-ventricolare [Marles et al., 2011]; l'inibizione di questi recettori sulla muscolatura liscia dei vasi porta alla loro vasocostrizione ed all'aumento della pressione sanguigna, sia sistolica che diastolica [Mort e Kruse, 2008; Higdon e Frei, 2006; Mandel, 2002]. Per questo motivo è presumibile un'eventuale azione sinergica tra caffeina e sinefrina nell'aumento della pressione arteriosa.

Uno studio clinico effettuato da Haller et al. (2005) ha, infatti, evidenziato un aumento della pressione sanguigna in soggetti in salute dopo l'assunzione di caffeina.

5.6 CONCLUSIONE DELLA RICERCA SISTEMATICA

Nonostante alcuni autori sostengano l'innocuità associata all'utilizzo degli estratti di *C. aurantium* negli integratori alimentari, il meccanismo con cui questi prodotti agiscono e gli studi clinici effettuati per confermare o negare questo meccanismo non danno evidenza sufficiente per garantire la sicurezza dell'estratto di arancio amaro.

Inoltre, la letteratura scientifica contiene un grande numero di eventi avversi e di studi clinici che riportano alterazioni funzionali a seguito dell'assunzione di questi prodotti. Molti di questi casi riportano effetti collaterali sul sistema cardiovascolare, probabilmente a causa della specifica attività delle amine simpaticomimetiche contenute nell'estratto della pianta.

Numerose reazioni avverse descritte nei casi clinici sono state classificate come "possibili" per la mancanza di dati sufficienti che consentono di stabilire con certezza una relazione tra l'assunzione dell'estratto della pianta e l'effetto avverso riportato. Quindi, sono necessarie evidenze appropriate sulla sicurezza di questi prodotti, sia per quanto riguarda gli effetti avversi più comuni, che per quelli la cui incidenza è più rara.

È fondamentale poter assicurare la sicurezza sia per quanto riguarda la popolazione generale ma in special modo per i gruppi di consumatori a rischio, considerando che questi prodotti vengono assunti più che altro da soggetti in sovrappeso o obesi che presentano diverse patologie associate alle loro condizioni. Fino alla conclusione di questi studi, l'utilizzo dell'estratto di *C. aurantium*, principalmente se associato ad altri agenti stimolanti, come ad esempio la caffeina, dovrebbe essere controllato, tenuto conto del rischio di una tossicità cardiovascolare.

Inoltre, la frequenza con cui gli effetti avversi sono stati dichiarati volontariamente, non può rappresentare la loro reale incidenza. Questo fatto è ancora più importante dal momento che si tratta di eventi avversi dovuti a integratori alimentari che contengono ingredienti naturali e sono liberamente in vendita. Questi fattori potrebbero influenzare la frequenza con cui gli effetti avversi vengono dichiarati, minimizzando la tendenza dei consumatori ad associare l'effetto avverso con l'utilizzo dei prodotti cosiddetti "naturali".

B-Ricerca di ammine attive

La ricerca di ammine attive è stata eseguita in 44 prodotti. Essi sono stati sottoposti a uno screening iniziale tramite TLC ed i campioni che sono risultati positivi sono stati analizzati in HPLC – MS.

5.7 TLC

5.7.1 Sensibilità

È stata valutata la sensibilità del metodo in TLC con diversi quantitativi di molecole standard. I risultati delle analisi condotte per calcolare il limite di determinazione sono mostrati in **Figura 17**. Come si può vedere, nel caso di efedrina, norefedrina, octopamina e sinefrina, l'uso del reattivo alla ninidrina aumenta la sensibilità. Per la yohimbina la sensibilità risulta paragonabile utilizzando la luce UV e il reattivo di Dragendorff.

La TLC si è dimostrata una tecnica adatta all'esecuzione delle analisi di screening preliminari in quanto gli LOD ottenibili consentono di determinare concentrazioni di analiti molto inferiori a quelle responsabili dei loro effetti farmacologici.

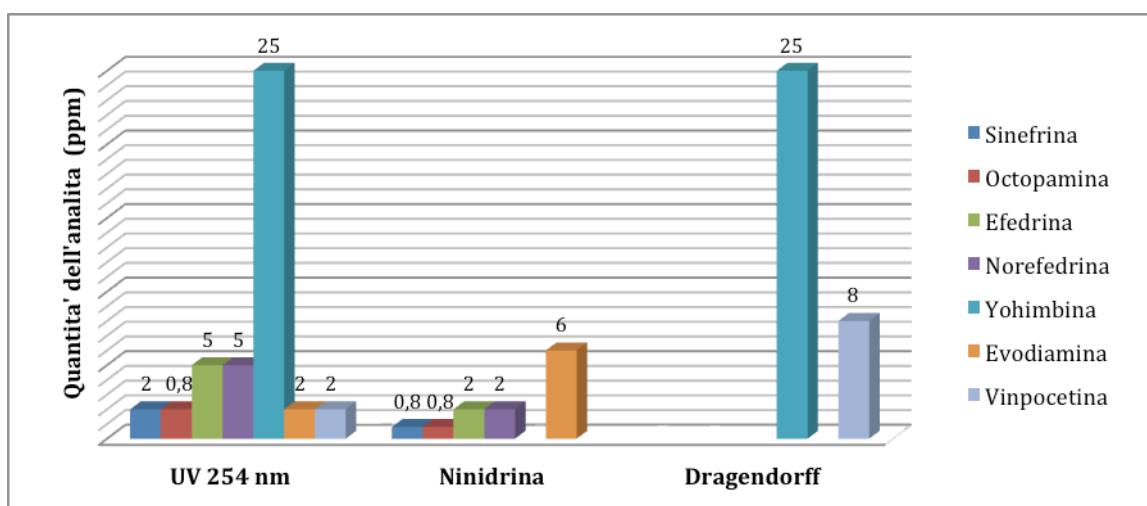


Figura 17- Limite di determinazione per le diverse ammine in esame ottenuto dopo visualizzazione con luce UV a 254 nm e con Reattivi Ninidrina o Dragendorff

5.7.2 Dati analitici relativi ai campioni

A titolo di esempio la **Figura 18**, illustra la TLC di un campione n° 37. L'estratto in cloroformio, preparato come descritto in Metodi, viene caricato sulla lastrina (100 μ L) in parallelo alle soluzioni standard alla concentrazione di 1 mg/mL (20 μ L). A seguito di esposizione a radiazione UV 254 nm (**A**), è possibile identificare una macchia con Rf analogo alla sinefrina standard e una macchia con Rf paragonabile all'efedrina. La rivelazione mediante reattivo alla Ninidrina (**B**) conferma la presenza di una macchia con Rf simile a quello della sinefrina, la cui presenza è per altro segnalata nell'etichetta del prodotto.

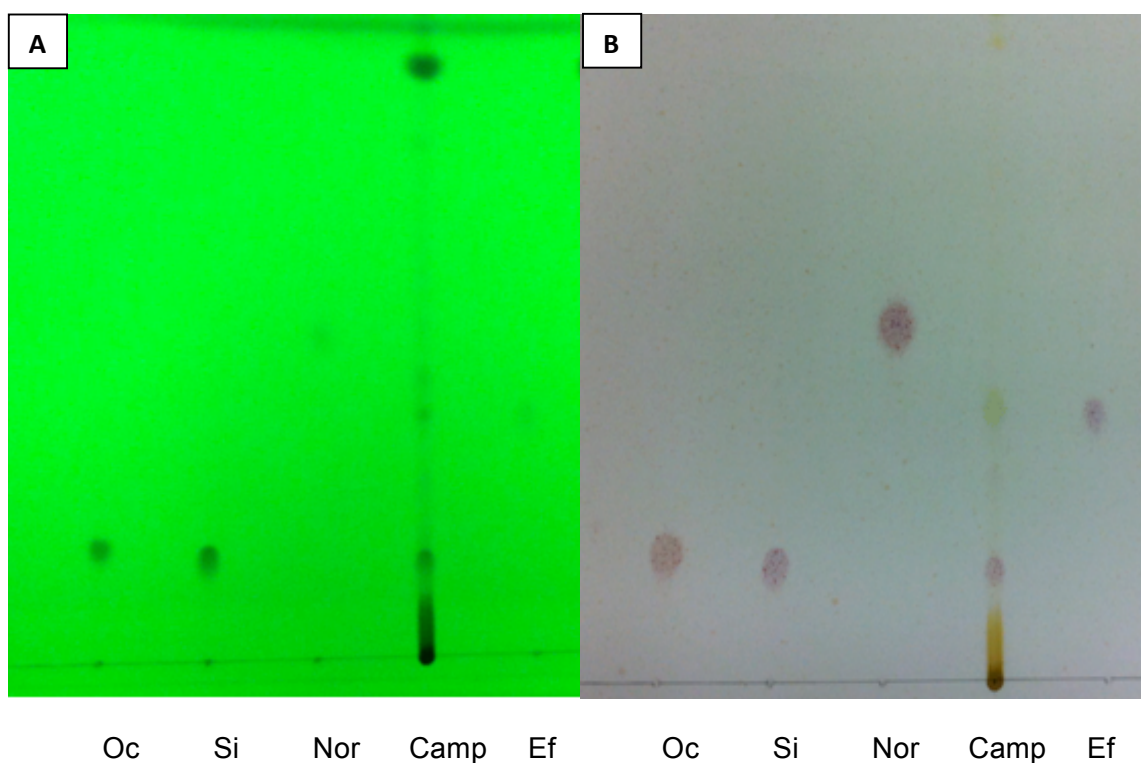


Figura 18 – TLC del campione n° 37: rivelazione con lampada UV 254 nm (**A**) e rivelazione con reattivo alla ninidrina (**B**)

Legenda:

Oc – Octopamina
Si – Sinefrina
Nor – Norefedrina
Camp – Campione
Ef – Efedrina

I risultati ottenuti dallo screening iniziale nei 44 campioni analizzati e la loro provenienza sono riportati nella **Tabella 9**, da cui risulta che 26 campioni hanno dimostrato negatività per gli analiti ricercati, mentre in 18 è stata rilevata la possibile presenza di octopamina, sinefrina o efedrina. Per questa ragione i campioni sono stati successivamente sottoposti alle analisi solo per la conferma e quantificazione dell'efedrina utilizzando il metodo ufficiale della AOAC [Roman, 2004] e della sinefrina ed octopamina applicando il metodo descritto da Putzbach et al. (2007) opportunamente da noi modificato per i nostri campioni.

Tabella 9 – Risultati delle analisi con TLC in 44 campioni

Numero campione	Provenienza	Indicazione riportata in etichetta/quantità dichiarata (ppm)	Positività in TLC
1	Italia	Ammine ND	-
2	Italia	Ammine ND	-
3	Stati Uniti d'America	Ammine ND	Sinefrina
4	Stati Uniti d'America	Ammine ND	-
5	Italia	Ammine ND	-
6	Italia	Ammine ND	Efedrina
7	Italia	Ammine ND	Efedrina e Sinefrina
8	Stati Uniti d'America	Ammine ND	Efedrina e Sinefrina
9	Stati Uniti d'America	Ammine ND	Efedrina
10	Stati Uniti d'America	Ammine ND	-
11	Italia	Ammine ND	Efedrina e Sinefrina

Tabella 9 - *Continuazione* - Risultati delle analisi con TLC in 44 campioni

Numero campione	Provenienza	Indicazione riportata in etichetta/quantità dichiarata (ppm)	Positività in TLC
12	Italia	Ammine ND	-
13	Italia	Ammine ND	Efedrina e Sinefrina
14	Italia	Ammine ND	-
15	Stati Uniti d'America	Ammine ND	-
16	Stati Uniti d'America	Ammine ND	-
17	Stati Uniti d'America	Ammine ND	Sinefrina
18	Italia	Ammine ND	-
19	Italia	Ammine ND	-
20	Italia	Ammine ND	-
21	Italia	Ammine ND	-
22	Italia	Ammine ND	-
23	Italia	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 11111	Sinefrina
24	Italia	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 960	Sinefrina
25	Italia	Ammine ND	-
26	Italia	Ammine ND	-

Tabella 9 - Continuazione - Risultati delle analisi con TLC in 44 campioni

Numero campione	Provenienza	Indicazione riportata in etichetta/quantità dichiarata (ppm)	Positività in TLC
27	Italia	Ammine ND	-
28	Italia	Ammine ND	-
29	Stati Uniti d'America	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 14478	Octopamina e Sinefrina
30	Stati Uniti d'America	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 14494	Octopamina e Sinefrina
31	Stati Uniti d'America	Sinefrina dall'estratto di <i>C. aurantium</i> (parte non specificata) / 48701	Octopamina e Sinefrina
32	Stati Uniti d'America	Sinefrina dall'estratto dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 7514	Sinefrina
33	Italia	Ammine ND	-
34	Stati Uniti d'America	Ammine ND	-
35	Stati Uniti d'America	Ammine ND	-

Tabella 9 - Continuazione - Risultati delle analisi con TLC in 44 campioni

Numero campione	Provenienza	Indicazione riportata in etichetta/quantità dichiarata (ppm)	Positività in TLC
36	Italia	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 2963	Sinefrina
37	Italia	Sinefrina dall'estratto dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 18345	Sinefrina
38	Italia	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 32258	Sinefrina
39	Cinese	Ammine ND	-
40	Cinese	Estratto dei frutti di <i>C. aurantium</i> / presenza e quantità di sinefrina non dichiarata	-
41	Italia	Ammine ND	-
42	Italia	Ammine ND	-
43	Italia	Ammine ND	-
44	Sconosciuta	Ammine ND	Octopamina

ND= non dichiarate

5.8 MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DEL METODO HPLC

Descrizione della procedura di convalida del metodo HPLC per l'analisi di sinefrina ed octopamina.

5.8.1 Valutazione dell'efficienza di estrazione

L'efficienza di estrazione è stata valutata confrontando due diversi solventi: metanolo e HCl 0.1 N. Si prelevano 0.5 g di campione (polvere omogenea, preparata come descritto per l'analisi in TLC) e si aggiungono 0.125 mg di ogni analita sospesi in metanolo (octopamina e sinefrina). Dopo aver portato a secco sotto flusso di azoto, il campione viene estratto con 50 mL di metanolo o HCl 0.1 N per 25 minuti sotto agitazione e poi iniettato in HPLC (100 μ L).

Di seguito, è stata eseguita un'altra prova in modo da ottimizzare il tempo per la procedura di estrazione con HCl 0.1 N. I campioni, preparati come descritto in precedenza, vengono estratti in HCl 0.1 N in 6 intervalli di tempo diversi: 30, 25, 20, 15, 10 e 5 minuti e poi iniettati in HPLC. Le prove sono state eseguite in tre replicazioni.

Le quantità medie estratte dopo 25 minuti di agitazione in metanolo sono risultate dell'85% \pm 2.69 (Media \pm DS) e dell'86% \pm 2.27 (Media \pm DS), per octopamina e sinefrina rispettivamente. La resa di estrazione, usando HCl 0.1 N e usando lo stesso tempo di agitazione, è di circa il 100% per entrambe le ammine. Il recupero totale, ottenuto con HCl 0.1N come estraente, è probabilmente dovuto alla salificazione delle ammine.

I risultati dell'ottimizzazione del tempo della procedura di estrazione in HCl 0.1 N sono illustrati in **Tabella 10**. Come si può osservare, dopo 10 minuti di estrazione il recupero è circa 100% per entrambi gli standard, quindi questo tempo è stato considerato ottimale.

Tabella 10 – Percentuale di recupero nei campioni a differenti tempi di estrazione

Tempo (min)	Octopamina recupero (%)	Sinefrina recupero (%)
30	102.37	100.84
25	100.62	104.54
20	100.48	101.88
15	99.97	97.8
10	99.83	99.85
5	92.49	94.33

5.8.2 Separazione con HPLC e idoneità del sistema

I campioni analizzati in questo studio sono integratori alimentari complessi che presentano nella loro composizione una grande varietà di estratti di piante, vitamine, aminoacidi, ecc. Fanno eccezione tre campioni che non contengono estratti di piante. La **Figura 19** riporta, come esempio, la composizione del campione n° 23.

Composizione Integratore Alimentare n° 23

Caffeina anidra, arancio amaro (*Citrus aurantium*, maltodestrina) scorza del frutto tit. 10% sinefrina, tè verde (*Camellia sinensis*, maltodestrina) foglie e.s. tit. 90% polifenoli 40% EGCG, acetil-L-tirosina, glucuronolattone, metabromina (*Theobroma cacao*, maltodestrine) semi e.s. tit. 6% teobromina, Matè (*Ilex paraguayensis*, maltodestrina) foglie e.s. tit. 3,6% xantine, coleus (*Coleus forskolii*, maltodestrine) radice e.s. tit. 20% forskolina, ashwagandha (*Withania somnifera*, maltodestrine) radice e.s. tit. 2,5% withannolidi, suma (*Pfaffia penicolata*, maltodestrine) radice e.s., rodiola (*Rhodiola rosea*, maltodestrine) e.s.tit. 3% rosavina, agente di carica: cellulosa microcristallina, calcio fosfato bibasico; cocolean (*Theobroma cacao*, maltodestrine) semi e.s. tit. 7% teobromina, gynostemma (*Gynostemma pentaphyllum*; maltodestrine) foglie e.s. tit. 80% gipenosidi, caffè verde (*Coffea arabica*, maltodestrina) semi e.s. tit. 45% acido ellagico, gugul (*Commiphora mukul*, biossido di silicio) resina e.s. tit. 2,5% gugusteroni, vitamina B3 (niacina) antiagglomeranti: magnesio stearato vegetale, biossido di silicio, *Capsicum annuum* frutti e.s., pepe nero (*Piper nigrum*) frutti e.s. tit. 95% piperina, potassio idruro.

Figura 19 – Composizione dell'integratore alimentare n° 23

La complessa composizione di questi campioni ha reso difficile l'interpretazione e separazione dei numerosi picchi presenti nei cromatogrammi, anche dopo l'utilizzo di diversi processi di purificazione.

In questo studio sono stati valutati diversi sistemi isocratici di eluizione, tra cui quello descritto da Putzbach et al. (2007). La separazione cromatografica di questi sistemi, pur efficienti, non è risultata idonea ed applicabile per l'analisi di campioni particolarmente complessi per la presenza di numerosi componenti i cui picchi interferivano frequentemente con gli analiti.

La **Figura 20** illustra il cromatogramma in HPLC ottenuto dal campione n° 23 utilizzando la procedura di estrazione e il sistema cromatografico descritto da Putzbach et al. (2007). Come si può osservare il cromatogramma presenta numerosi picchi sovrapposti dovuti ai diversi ingredienti presenti nei campioni e che interferiscono con i picchi degli analiti d'interesse.

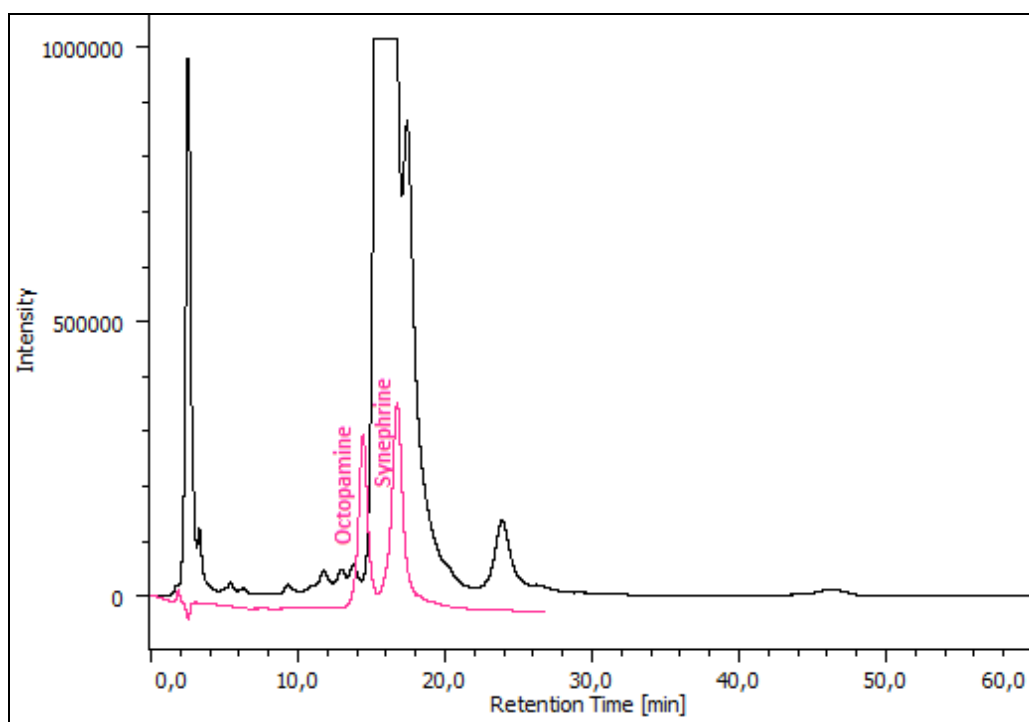


Figura 20 – Cromatogramma in HPLC ottenuto dal campione n° 23 utilizzando il sistema di eluizione isocratico.

L'elevato numero di composti da ricercare ha guidato la scelta verso tecniche analitiche efficaci ed allo stesso tempo veloci al fine di ottenere risultati rapidi, comprensibili e con sensibilità sufficiente a identificare le sostanze di interesse. I problemi riscontrati sono stati risolti con successo usando:

- 1) la cromatografia di coppia ionica in associazione ad appropriate concentrazioni di sodio dodecil solfato in ambiente acido;
- 2) la ricerca di un'adeguata fase in gradiente di concentrazione al fine di ottimizzare la separazione tra i due analiti e tra questi e i componenti interferenti della matrice;
- 3) utilizzo del rivelatore fluorimetrico che ha fornito maggiore specificità e sensibilità all'analisi.

Il sistema cromatografico e il gradiente scelto sono riportati in dettaglio in Metodi (Paragrafo 4.3.3). La **Figura 21** mostra un cromatogramma ottenuto per lo stesso campione n° 23 con il sistema cromatografico ottimizzato. I due analiti sono separati in modo soddisfacente e il tracciato non presenta picchi interferenti.

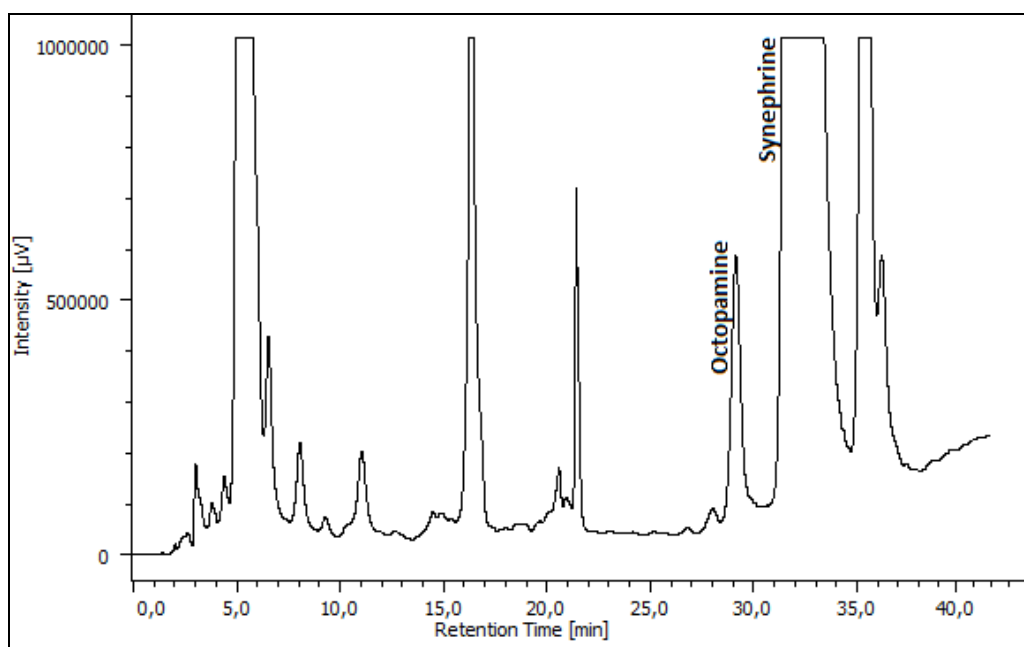


Figura 21 – Cromatogramma in HPLC ottenuto dal campione n° 23 utilizzando il sistema cromatografico ottimizzato. Per le condizioni vedere paragrafo 4.3.3

Il sistema cromatografico viene giornalmente controllato applicando un test di idoneità i cui risultati sono riportati in **Tabella 11**.

Tabella 11 – I risultati dei test di idoneità del sistema (media di 6 determinazioni)

Composto	tR (min) (media±DS)	K ⁽¹⁾ (media±DS)	α ⁽²⁾ (media±DS)	Fattore di simmetria (media±DS)	N° di piatti teorici (media±DS)
Octopamina	29.0±0.34	8.66±0.23	0.98±0.01	1±0.04	98910±3477
Sinefrina	29.5±0.33	8.83±0.28	0.98±0.01	1.146±0.01	101146±7103

¹ Fattore di ritenzione (K)= (tR – t₀)/t₀ dove t₀ e tR sono rispettivamente il tempo di ritenzione del solvente e dei componenti analizzati.

² Fattore di separazione (α)= (tR₂ – T₀)/(tR₁-t₀) dove tR₂ e tR₁ sono i tempi di ritenzione di due picchi vicini.

5.8.3 Sensibilità

È stata valutata la sensibilità del metodo delle ammine in HPLC.

Il LOD è di 0.1 µg/mL e il LOQ è di 1 µg/mL per entrambe le ammine.

I picchi degli analiti al LOQ erano identificabili, separati e riproducibili con una precisione del 14 e 4% e accuratezza del 88.5% e 103%, per l'octopamina e sinefrina rispettivamente.

5.8.4 Selettività e Specificità

Sono state analizzate la selettività e la specificità del metodo in HPLC per le ammine. I cromatogrammi di 6 diversi campioni bianchi non contenevano picchi di co-eluzione aventi area > 18% rispetto a quella degli standard al livello del LOQ. I 6 campioni hanno mostrato uno scostamento medio dalla concentrazione nominale a livello del LOQ di 11.61% e 4.29% per octopamina e sinefrina. Inoltre, non è stata osservata alcuna interferenza con gli standard. La **Figura 22** mostra un esempio di cromatogramma relativo ad un bianco in cui non si osserva alcun picco associabile agli analiti in esame.

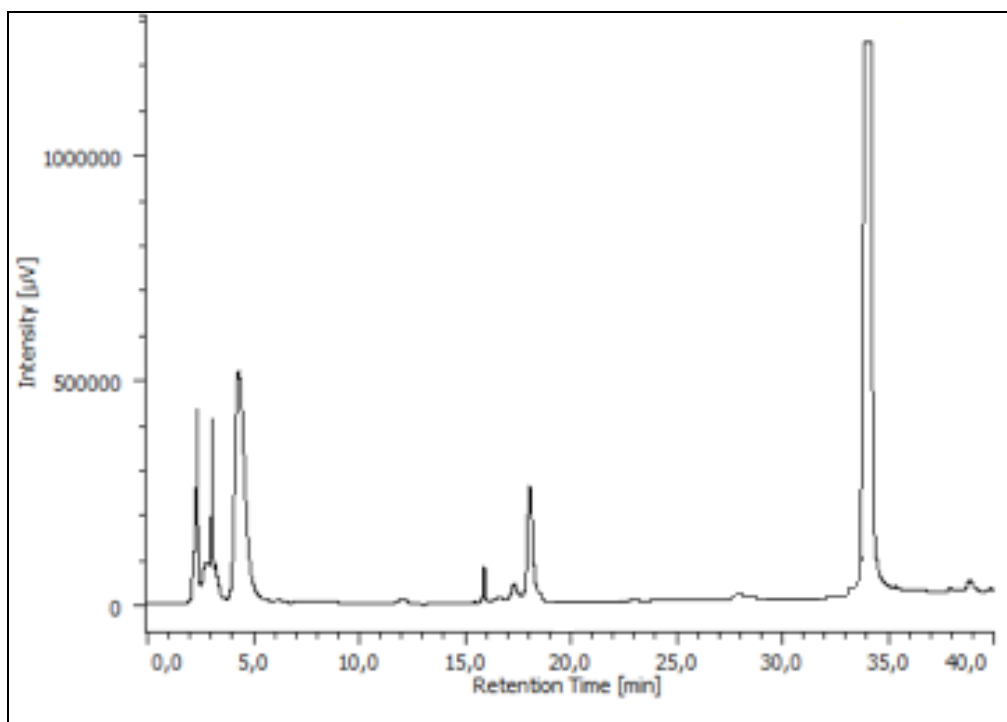


Figura 22 – Cromatogramma in HPLC di una matrice bianca estratta. Per le condizioni cromatografiche vedere paragrafo 4.3.3

5.8.5 Accuratezza e Precisione

Sono state calcolate l'accuratezza e la precisione al fine di determinare le prestazioni del metodo in HPLC.

I dati di analisi della prestazione sono riassunti nelle **Tabelle 12 e 13**. L'accuratezza del dosaggio è tra $\pm 11.47\%$ per tutte le concentrazioni. La precisione del within-day e between-day non supera il 14.57% per l'octopamina e 6.59% per sinefrina a tutte le concentrazioni e rientra nei criteri richiesti dalla FDA.

Tabella 12 – Dati di prestazione riferiti all'accuratezza e precisione del saggio per l'octopamina

Concentrazione nota (ppm)	Concentrazione media misurata (ppm) (media \pm DS)	Accuratezza (%)	Precisione Within-day (%RSD)	Precisione Between-day (%RSD)
1	0.983 \pm 0.113	88.53	13.69	14.57
5	4.719 \pm 0.203	98.65	4.46	5.00
10	9.191 \pm 0.270	103.67	2.98	4.57

Tabella 13 – Dati di prestazione riferiti all'accuratezza e precisione del saggio per la sinefrina

Concentrazione nota (ppm)	Concentrazione media misurata (ppm) (media \pm DS)	Accuratezza (%)	Precisione Within-day (%RSD)	Precisione Between-days (%RSD)
1	1.384 \pm 0.045	103.43	3.64	6.59
5	6.348 \pm 0.290	100.39	4.66	5.47
10	12.611 \pm 0.623	104.79	4.13	4.83

5.8.6 Recupero

La **Figura 23** mostra il confronto tra i risultati analitici degli standard a 3 concentrazioni estratti rispetto agli standard puri. I risultati sono illustrati con due linee parallele sovrapposte a dimostrazione del recupero totale dei due standard. Infatti, le medie dei recuperi % ottenuti sono 99.79 (\pm 1.29) e 99.02 (\pm 1.36) per octopamina e sinefrina, rispettivamente. I risultati sono riportati in **Tabella 14**.

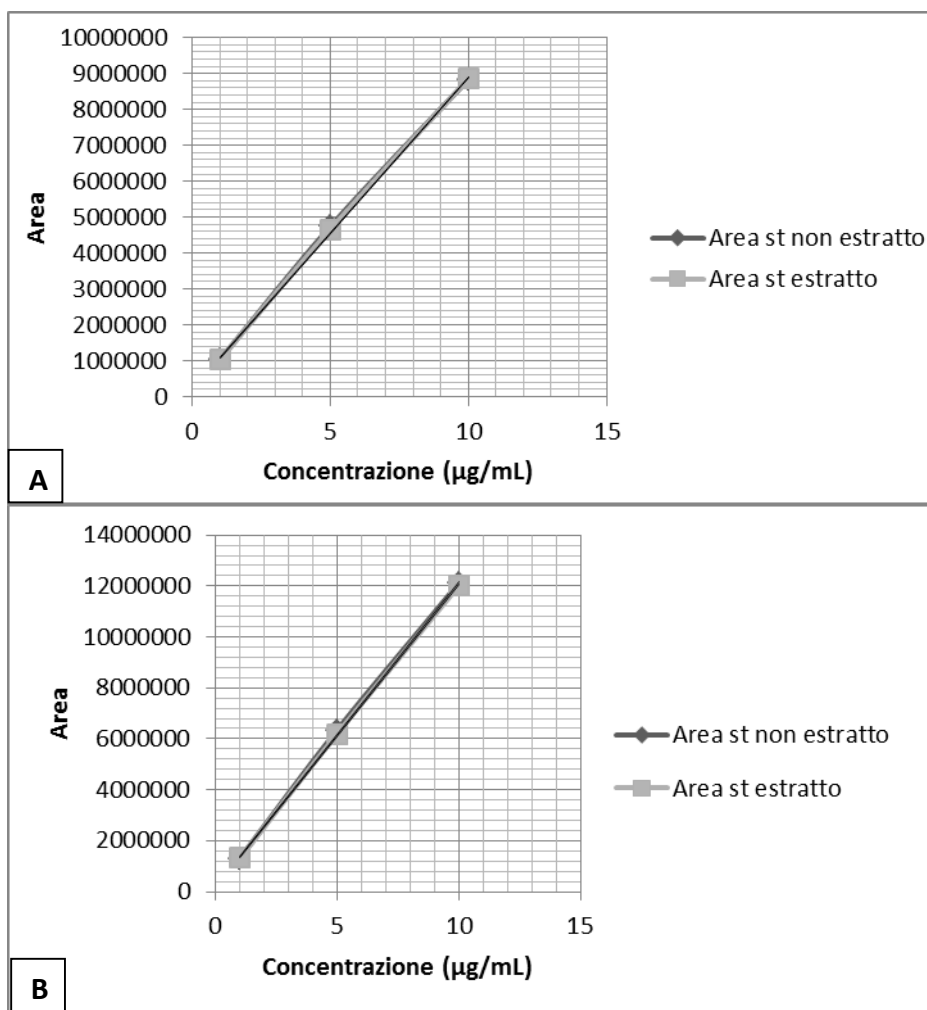


Figura 23 – Confronto tra i grafici che mostrano la sovrapposizione dei risultati tra standard estratti e non estratti di octopamina (**A**) e sinefrina (**B**)

Tabella 14 - Risultati del recupero di sinefrina e octopamina a 3 diverse concentrazioni

Quantità aggiunta (ppm)	Recupero di Octopamina (%) (media±DS)	Recupero di Sinefrina (%) (media±DS)
1	100.84±1.98	99.14±1.64
5	98.35±1.71	97.62±1.29
10	100.18±1.24	100.30±1.38
(Media finale±DS)	99.79±1.29	99.02±1.36

5.8.7 Linearità

Il saggio è lineare nell'intervallo di concentrazioni di 1 - 15 µg/mL, con un coefficiente medio di correlazione (R^2) di 0.9990 (± 0.0009) per octopamina e 0.9984 (± 0.0011) per sinefrina. I parametri medi delle funzioni di regressione lineare sono $y = 106x - 154649$ per l'octopamina e $y = 106x + 3780$ per la sinefrina. Non sono state osservate variazioni significative della pendenza tra le diverse curve di calibrazione. La **Figura 24** mostra le rette di calibrazione ottenute con l'utilizzo di 7 punti, includendo un bianco e un LOQ.

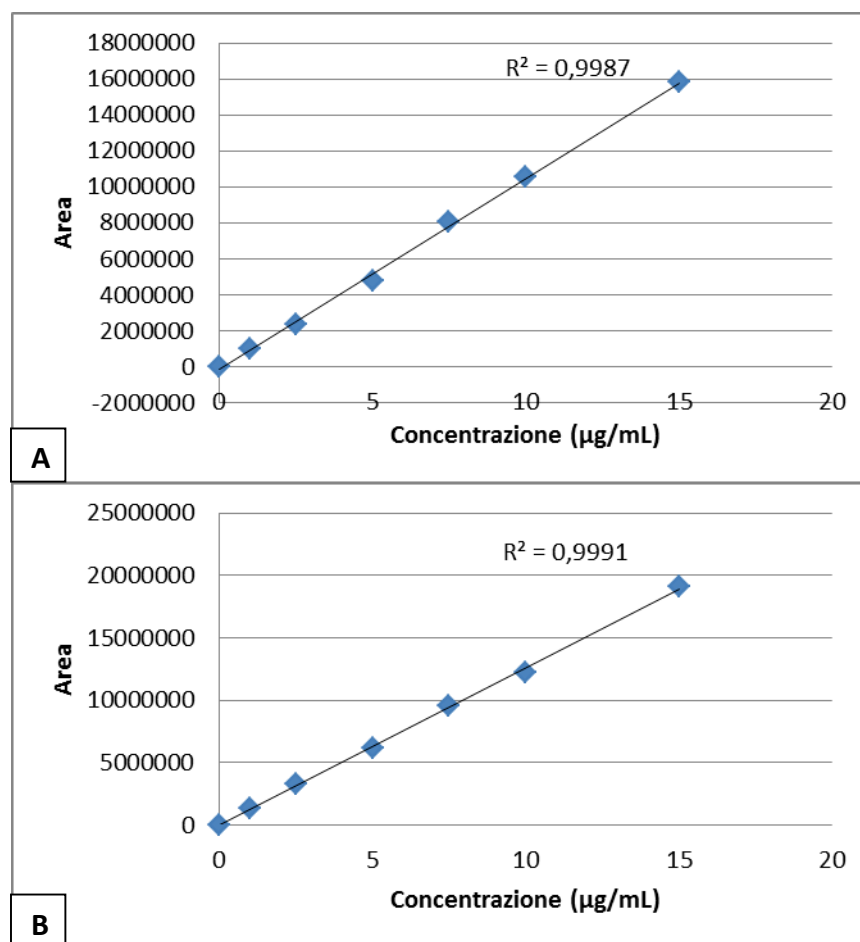


Figura 24 – Retta di calibrazione dell'octopamina (A) e sinefrina (B) da campioni bianchi addizionati ed estratti

5.8.8 Stabilità

Le prove effettuate a breve e lungo termine hanno dimostrato la stabilità delle soluzioni standard di octopamina e sinefrina conservate in HCl 0.1 N e in una matrice bianca a base di estratti di piante. Inoltre, prove di congelamento/scongelamento hanno mostrato che gli analiti sono stabili almeno per tre cicli di congelamento/scongelamento. I risultati delle prove di stabilità per l'octopamina e la sinefrina sono riassunti in **Tabella 15**.

Tabella 15 – Dati di stabilità per octopamina e sinefrina in differenti condizioni

Condizioni	Analita	Matrice	Concentrazione media tempo 0 (ppm)	Concentrazione media finale (ppm)	DS	RSD (%)
Temperatura ambiente, 8 h	Octopamina	HCl	1.11	0.977	0.1078	11.04
		0.1N	9.11	9.153	0.3107	3.39
	Sinefrina	HCl	1.34	1.387	0.0550	3.97
		0.1N	12.03	12.513	0.5036	4.02
-20°C, 1 mese	Octopamina	HCl	1.11	1.090	0.1253	11.49
		0.1N	9.11	9.193	0.2050	2.23
	Sinefrina	HCl	1.34	1.365	0.0071	0.52
		0.1N	12.03	12.923	0.6053	4.68
Temperatura ambiente, 8 h	Octopamina	Bianco	1.09	1.037	0.1415	13.65
			9.13	9.390	0.4877	5.19
	Sinefrina	Bianco	1.32	0.927	0.0513	5.54
			12.01	12.487	0.4552	3.64
-20°C, 1 mese	Octopamina	Bianco	1.09	0.977	0.1002	10.26
			9.13	9.280	0.3439	3.71
	Sinefrina	Bianco	1.32	1.460	0.1273	8.72
			12.01	13.14	0.3487	2.65
3 cicli di congelamento (-20°C) / scongelamento	Octopamina	Bianco	1.09	1.113	0.2491	9,76
			9.13	9.420	0.4616	4.90
	Sinefrina	Bianco	1.32	0.963	0.0503	5.22
			12.01	12.433	0.4310	3.47

5.9 INDAGINE DEI CAMPIONI IN HPLC

I campioni che sono risultati positivi allo screening con TLC sono stati analizzati in HPLC al fine di confermare i risultati ottenuti e nel caso quantificare i composti di interesse. I risultati ottenuti in HPLC concordano con quelli ottenuti in TLC. Fa eccezione il campione n° 44 dove l'analisi TLC ha segnalato la presenza di octopamina mentre non viene confermata in HPLC. La macchia visualizzata in TLC, era molto probabilmente associata ad un amminoacido presente nel campione che reagisce con la Ninidrina e ha R_f simile.

La **Figura 25 A** mostra una tipica separazione cromatografica dell'octopamina e sinefrina in un campione di integratore alimentare contenente *C. aurantium* (prodotto n° 29), mentre la **Figura 25 B** mostra una separazione cromatografica di efedrina in un caso di campione in cui l'efedrina è presente in piccole quantità (prodotto n° 6).

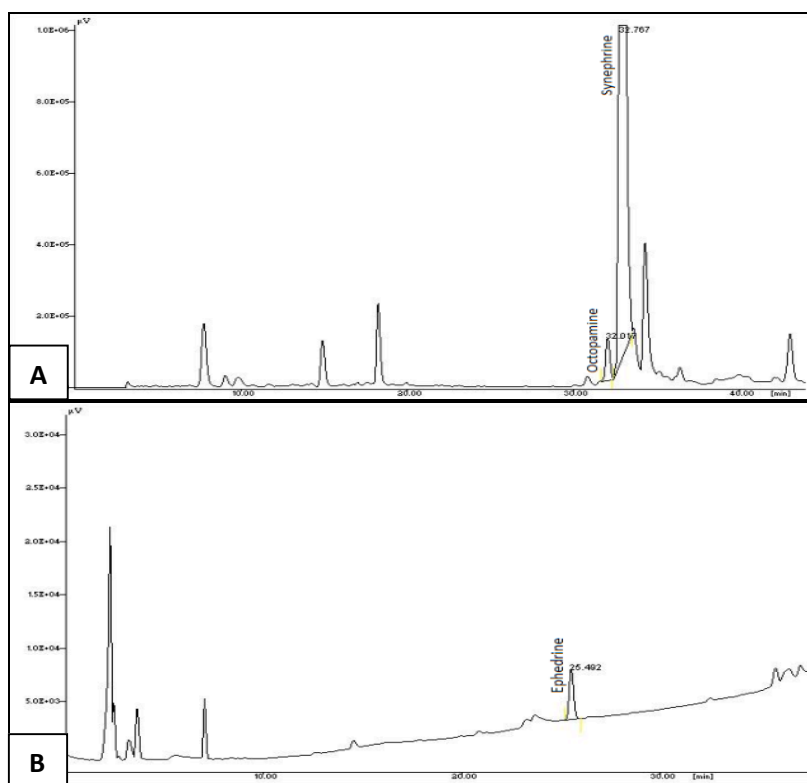


Figura 25 – HPLC cromatogramma del campione estratto numero 29 che contiene octopamina e sinefrina provenienti dal *C. aurantium* (A). HPLC cromatogramma del campione estratto numero 6 in cui la presenza di efedrina non dichiarata in etichetta del prodotto (B).

5.10 INDAGINE SUI CAMPIONI IN LC-MS

Le **Figure 26 - 28** mostrano lo spettro di massa ottenuto dalla frammentazione delle molecole standard usate per identificare gli analiti nei campioni. La **Figura 29** mostra lo spettro di massa di queste ammine trovate in alcuni campioni.

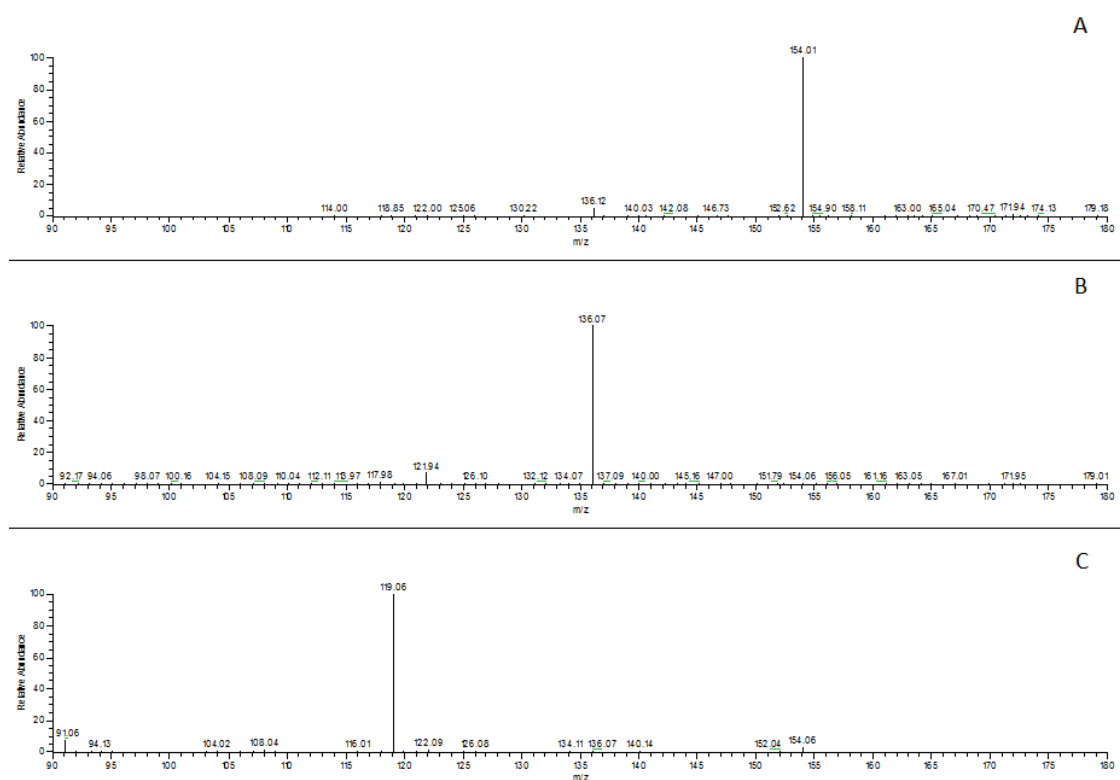


Figura 26 – Spettro di massa (MS) rappresentante lo ione molecolare 154 m/z relativo all’octopamina (**A**). Spettro di MS² ottenuto dalla collisione dello ione pseudo-molecolare a m/z 154 dell’octopamina (m/z 154) (**B**). Spettro di MS³ ottenuto per collisione dello ione a 136 m/z di octopamina (**C**)

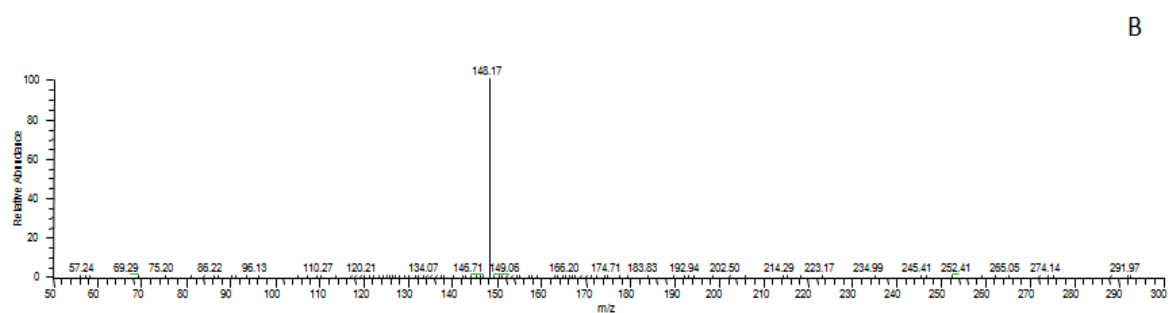
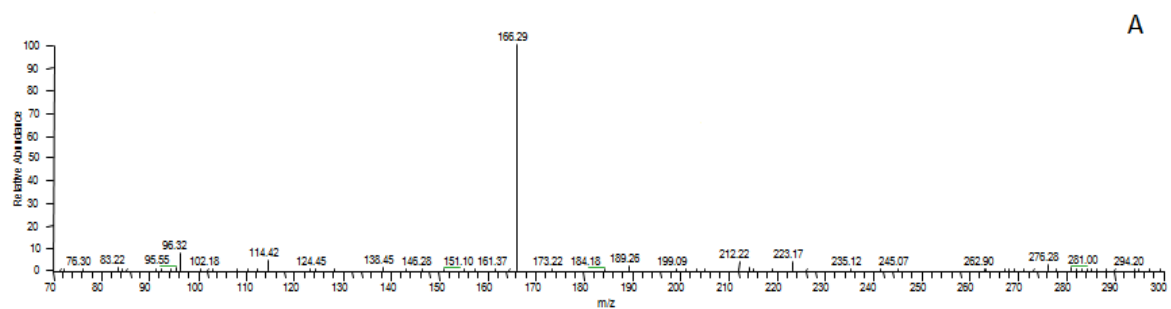


Figura 27 – Spettro di massa rappresentante lo ione molecolare 166 m/z relativo all’efedrina (A). Spettro di MS² ottenuto dalla collisione dello ione pseudo-molecolare di efedrina (166 m/z) (B)

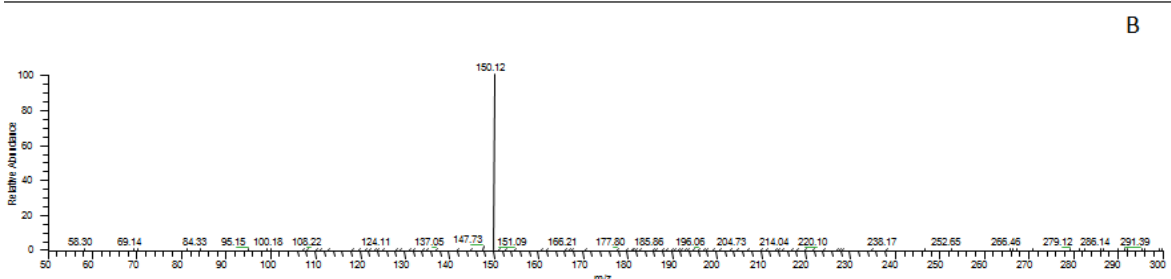
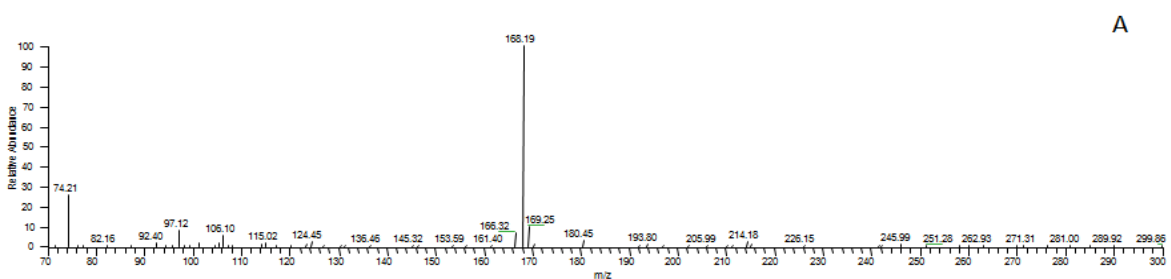


Figura 28 – Spettro di massa rappresentante lo ione molecolare a 168 m/z relativo alla sinefrina (A). Spettro di MS² ottenuto dalla collisione dello ione pseudo-molecolare di sinefrina (168 m/z) (B)

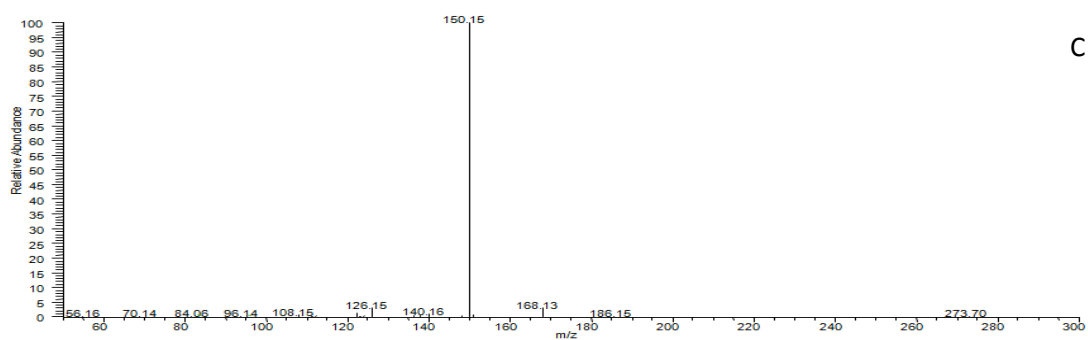
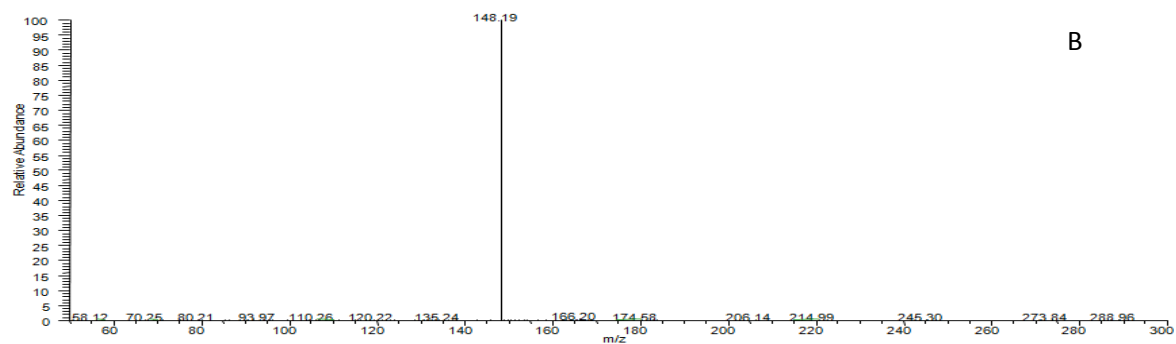
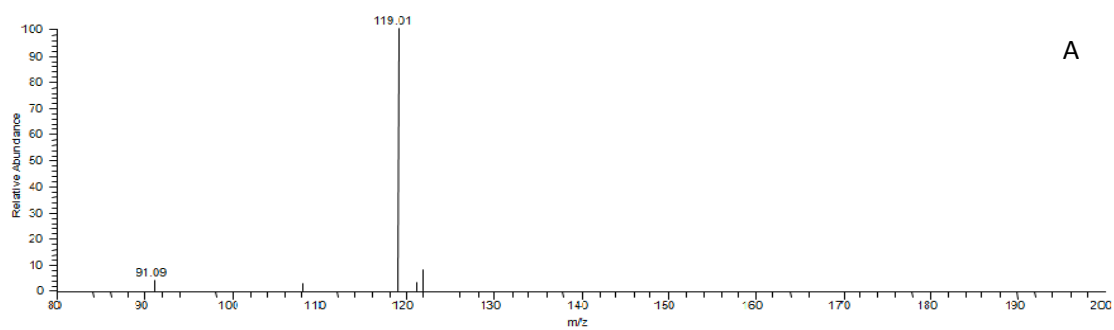


Figura 29 - Spettro di MS^3 ottenuto dalla collisione dello ione a 136 m/z di octopamina presente nel campione 29 (A). Spettro di MS^2 ottenuto dalla collisione dello ione molecolare a 166 m/z di efedrina presente nel campione numero 6 (B). Spettro di MS^2 ottenuto dalla collisione dello ione a 168 m/z di sinefrina presente nel campione 29 (C)

5.11 RISULTATI GENERALI E DISCUSSIONE

La **Tabella 16** riassume i risultati in TLC, LC/MS e HPLC ottenuti su i 44 prodotti analizzati. Inoltre un confronto è stato fatto tra quanto dichiarato in etichetta e la quantità media individuata tramite quantificazione in HPLC.

Tabella 16 – Risultati generali dei saggi dei 44 campioni

Numero campione	Indicazione riportata in etichetta/quantità dichiarata (ppm)	Positività in TLC	Presenza confermata da LC/MS	Quantitativo calcolato da HPLC (ppm) (media±DS)
1	Ammine ND	-	-	-
2	Ammine ND	-	-	-
3	Ammine ND	Sinefrina	Sinefrina	5.07±0.07
4	Ammine ND	-	-	-
5	Ammine ND	-	-	-
6	Ammine ND	Efedrina	Efedrina	3.77±0.06
7	Ammine ND	Efedrina e Sinefrina	Efedrina	2.89±0.04
			Sinefrina	1.95±0.02
8	Ammine ND	Efedrina e Sinefrina	Efedrina	3.19±0.04
			Sinefrina	36.43±0.12
9	Ammine ND	Efedrina	Efedrina	9.97±0.09
10	Ammine ND	-	-	-
11	Ammine ND	Efedrina e Sinefrina	Efedrina	31.64±0.21
			Sinefrina	14.6±0.08

Tabella 16 - Continuazione - Risultati generali dei saggi dei 44 campioni

Numero campione	Indicazione riportata in etichetta/quantità dichiarata (ppm)	Positività in TLC	Presenza confermata da LC/MS	Quantitativo calcolato da HPLC (ppm) (media±DS)
12	Ammine ND	-	-	-
13	Ammine ND	Efedrina e Sinefrina	Efedrina	5.8±0.07
			Sinefrina	4.4±0.03
14	Ammine ND	-	-	-
15	Ammine ND	-	-	-
16	Ammine ND	-	-	-
17	Ammine ND	Sinefrina	Sinefrina	8.9±0.05
18	Ammine ND	-	-	-
19	Ammine ND	-	-	-
20	Ammine ND	-	-	-
21	Ammine ND	-	-	-
22	Ammine ND	-	-	-
23	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 11111	Sinefrina	Sinefrina	11310±15.36
24	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 960	Sinefrina	Sinefrina	920±4.87
25	Ammine ND	-	-	-
26	Ammine ND	-	-	-

Tabella 16 - Continuazione - Risultati generali dei saggi dei 44 campioni

Numero campione	Indicazione riportata in etichetta/quantità dichiarata (ppm)	Positività in TLC	Presenza confermata da LC/MS	Quantitativo calcolato da HPLC (ppm) (media±DS)
27	Ammine ND	-	-	-
28	Ammine ND	-	-	-
29	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 14478	Octopamina e Sinefrina	Octopamina	435±6.27
			Sinefrina	21739±92.98
30	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 14494	Octopamina e Sinefrina	Octopamina	370±1.54
			Sinefrina	1959±26.87
31	Sinefrina dall'estratto di <i>C. aurantium</i> (parte non specificata) / 48701	Octopamina e Sinefrina	Octopamina	74837±161.5
			Sinefrina	68182±162.1
32	Sinefrina dall'estratto dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 7514	Sinefrina	Sinefrina	11570±26.98
33	Ammine ND	-	-	-
34	Ammine ND	-	-	-
35	Ammine ND	-	-	-

Tabella 16 - Continuazione - Risultati generali dei saggi dei 44 campioni

Numero campione	Indicazione riportata in etichetta/quantità dichiarata (ppm)	Positività in TLC	Presenza confermata da LC/MS	Quantitativo calcolato da HPLC (ppm) (media±DS)
36	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 2963	Sinefrina	Sinefrina	2936±13.54
37	Sinefrina dall'estratto dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 18345	Sinefrina	Sinefrina	18385±37.18
38	Sinefrina dall'estratto della buccia dei frutti di <i>C. aurantium</i> / 32258	Sinefrina	Sinefrina	32204±41.4
39	Ammine ND	-	-	-
40	Estratto dei frutti di <i>C. aurantium</i> / presenza e quantità di sinefrina non dichiarata	-	-	-
41	Ammine ND	-	-	-
42	Ammine ND	-	-	-
43	Ammine ND	-	-	-
44	Ammine ND	Octopamina	-	-

ND= non dichiarate

La sinefrina è stata rilevata e dosata in 15 campioni (n° 3, 7, 8, 11, 13, 17, 23, 24, 29, 30, 31, 32, 36, 37 e 38).

In 6 di questi prodotti (n° 3, 7, 8, 11, 13 e 17) né il *C. aurantium* né la sinefrina erano dichiarati in etichetta. 5 di questi campioni mostrano concentrazioni che non superano i 760 mg/giorno, probabilmente dovuto a contaminazione accidentale. In un solo campione è stata misurata una quantità corrispondente a 8 mg/giorno di sinefrina e questa quantità potrebbe essere associata ad un' adulterazione intenzionale in quanto nessuna fonte di sinefrina è stata dichiarata.

In 9 prodotti (n° 23, 24, 29, 30, 31, 32, 36, 37 e 38) la sinefrina è stata dichiarata in etichetta e la sua presenza è associata all'estratto di *C. aurantium*. In 8 di questi la dose giornaliera è all'interno del limite stabilito in Italia di 30 mg, mentre in un altro campione (n° 31) il contenuto determina il superamento di tale apporto (42 mg/giorno). Due prodotti mostrano una concentrazione equivalente a quelle dichiarate sulla confezione e 7 prodotti invece hanno dimostrato concentrazioni entro il 35-110% superiore a quelle riportate in etichetta.

In un caso (campione n° 40) in cui la presenza di sinefrina era indicata in etichetta in quantità tale da apportare 134 mg al giorno, si è in realtà analiticamente riscontrata la sua assenza.

Per quanto riguarda l'efedrina questa è stata rilevata in 6 prodotti (n° 6, 7, 8, 9, 11, 13) ma in nessun caso era dichiarata in etichetta. Cinque campioni contenevano quantità inferiori a 760 mg/giorno mentre un campione (n° 11) mostrava una quantità corrispondente ad un apporto di 1.6 mg/giorno. Queste quantità, sebbene indesiderabili e in parte inspiegabili, non dovrebbero rappresentare un rischio per il consumatore; infatti, non dovrebbero essere in grado di dare effetti farmacologici né tossici, considerando che effetti avversi sono stati registrati nell'uomo con la somministrazione di circa 20 mg di alcaloidi dell'Ephedra [Haller et al., 2005]. In tutti i campioni, la presenza delle piante contenenti efedrina o piante del genere *Ephedra sp.* non era stata dichiarata in etichetta, quindi la presenza di efedrina non può essere associata ad un ingrediente a base vegetale. È importante sottolineare che in Italia l'uso di efedrina e di ingredienti vegetali che la contengono non è ammessa negli integratori alimentari.

L'octopamina è stata individuata in 3 campioni (n° 29, 30, 31). Sebbene non sia permessa dalle normative italiane, i prodotti commerciali che la contengono vengono di solito importati dagli Stati Uniti d'America dove l'octopamina non è vietata. Nel caso specifico il prodotto presentava un'etichetta in italiano priva di indicazioni relative all'octopamina che era invece inclusa tra gli ingredienti dell'etichetta originale sottostante. Due campioni contenevano una quantità di octopamina corrispondente ai valori normali presenti nell'estratto di *C. aurantium* (mg per dose). In un terzo campione (n° 31) è stata quantificata una concentrazione di octopamina corrispondente a 46 mg/giorno e questo quantitativo è probabilmente associato ad un'aggiunta intenzionale.

C-Ricerca di ormoni steroidei

La ricerca di ormoni steroidei è stata eseguita in 35 prodotti. Essi sono stati sottoposti a uno screening iniziale tramite TLC e i campioni che sono risultati positivi sono stati analizzati in LC/MS.

5.12 TLC

5.12.1 Sensibilità

È stata valutata la sensibilità del metodo in TLC con diversi quantitativi di molecole standard. I risultati delle analisi condotte per ottenere il limite di determinazione sono mostrati in **Figura 30**. In **Tabella 17** vengono riassunti i risultati dei saggi rispetto a diversi tipi di rivelazione.

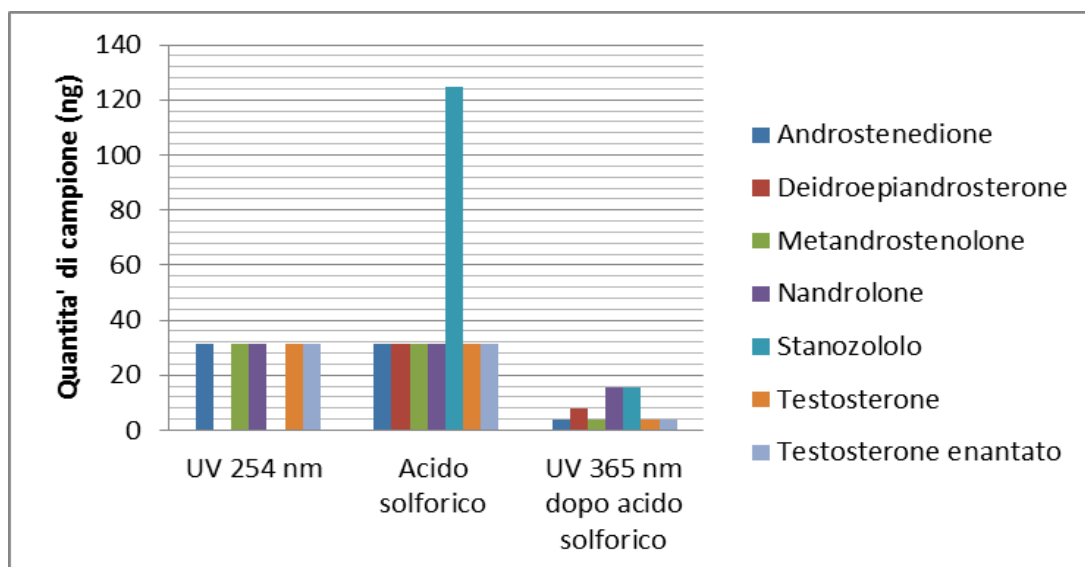


Figura 30 – Limiti di determinazione degli analiti steroidei (ng) dopo visualizzazione con luce UV 254 nm, spray di acido solforico e UV 365 dopo reazione con acido solforico

Tabella 17 - Limiti di determinazione degli analiti steroidei nelle diverse condizioni di rilevazione

Analita	UV 254 nm (ng)	Acido solforico (ng)	UV 365 nm dopo acido solforico (ng)	Valori in ppm nei campioni (ppm)^
Androstenedione	31.2	31.2	3.9	0.39
Deidroepiandrosterone	NE	31.2	7.8	0.78
Metandrostenolone	31.2	31.2	3.9	0.39
Nandrolone	31.2	31.2	15.6	1.56
Stanozololo	NE	125	15.6	1.56
Testosterone	31.2	31.2	3.9	0.39
Testosterone enantato	31.2	31.2	3.9	0.39

^ relativa alla rilevazione più sensibile ovvero UV a 365 nm dopo acido solforico

NE= non evidenziabile

Come si può osservare, utilizzando la luce UV 365 nm dopo aver spruzzato la lastrina con acido solforico la rilevazione ha mostrato una maggiore sensibilità rispetto agli altri metodi.

I risultati ottenuti riportano quantità molto più basse di quelle normalmente presenti nei prodotti quindi il metodo di ricerca risulta essere adatto per l'analisi di questi campioni.

5.12.2 Dati analitici relativi ai campioni

Le **Figure 31** e **32** riportano come esempio la TLC del campione n° 23. L'estratto in metanolo, preparato come descritto in Metodi, viene caricato sulla lastrina (10 µL) in parallelo alle soluzioni standard degli steroidi alla concentrazione di 1 mg/mL (15 µL).

A seguito dei diversi tipi di rilevazione, si sono ottenuti i seguenti risultati:

In Figura 31 **(A)** si osserva una macchia compatibile con testosterone enantato, mentre in Figura 31 **(B)** si identifica una macchia riconducibile al nandrolone, anche se la riproduzione della lastrina non consente di apprezzare in modo significativo la macchia.

In Figura 32 **(A)** si osservano due macchie che potrebbero essere riconducibili alla presenza di testosterone enantato e nandrolone. In Figura 32 **(B)** invece le macchie sono scarsamente visibili non permettendo l'individuazione di una possibile positività.

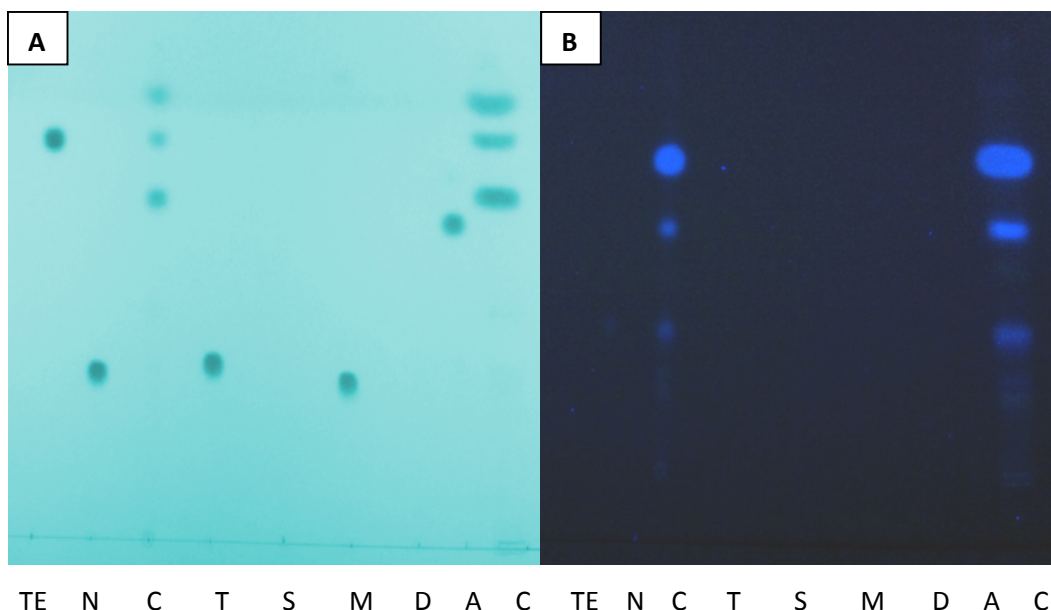


Figura 31 - TLC del campione n° 23 e degli steroidi standard rilevati alla luce UV 254 nm (A) e alla luce UV 365 nm (B)

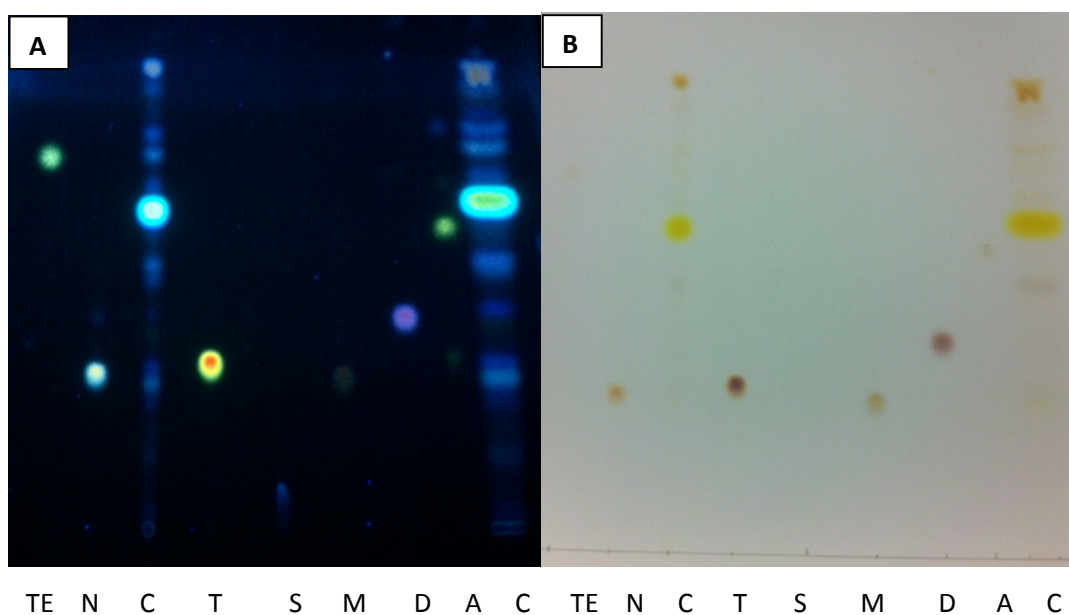


Figura 32 - TLC del campione n° 23 e degli steroidi standard e rilevazione con acido solforico ed esposizione alla luce UV 365 nm (A) e alla luce visibile (B)

Legenda:

TE	= Testosterone Enantato	N	= Nandrolone
C	= Campione	T	= Testosterone
S	= Stanozololo	M	= Methandrostenolone
D	= Deidroepiandrosterone	A	= Androstenedione

I risultati ottenuti dallo screening iniziale nei 35 campioni analizzati e la loro provenienza sono riportati nella **Tabella 18**, da cui risulta che 27 campioni hanno dimostrato negatività rispetto agli analiti ricercati, mentre in 8 si è stata rilevata la possibile presenza di almeno uno degli steroidi sotto indagine.

Tabella 18 – Risultati delle analisi con TLC in 35 campioni

Campione Nro	Provenienza	Positività in TLC
1	Italia	-
2	Italia	-
3	Italia	-
4	Italia	-
5	Italia	-
6	Italia	-
7	Italia	-
8	Italia	-
9	Italia	-
10	Italia	-
11	Stati Uniti d’America	-
12	Stati Uniti d’America	-
13	Stati Uniti d’America	-
14	Stati Uniti d’America	-
15	Italia	-
16	Stati Uniti d’America	-
17	Stati Uniti d’America	-

Tabella 18 - *Continuazione* - Risultati delle analisi con TLC in 35 campioni

Campione Nro	Provenienza	Positività in TLC
18	Italia	-
19	Italia	-
20	Italia	-
21	Cinese	-
22	Cinese	-
23	Sconosciuta	Nandrolone e Test. Enantato
24	Sconosciuta	-
25	Sconosciuta	Test. Enantato
26	Sconosciuta	Test. Enantato
27	Sconosciuta	-
28	Sconosciuta	Stanozololo
29	Sconosciuta	Stanozololo
30	Sconosciuta	Testosterone e Test. Enantato
31	Stati Uniti d'America	Deidroepiandrosterona
32	Sconosciuta	Stanozololo
33	Italia	-
34	Italia	-
35	Italia	-

5.13 MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DEL METODO LC-MS

Descrizione della procedura di convalida del LC-MS per la ricerca di ormoni steroidei.

5.13.1 Scelta delle colonne per LC

Al fine di scegliere la colonna più adatta per gli analiti interessati, sono state messe a confronto 3 colonne per la cromatografia liquida: ODS-2 C18, Hypersil GOLD e Hypersil GOLD AQ (per ulteriore dettagli consultare la sezione Materiali punto 2.11).

Il confronto si basa sull'analisi di una miscela dei vari standard in soluzione metanolo/acqua (1:1, v/v) utilizzando le 3 colonne in esame. Per ogni colonna l'analisi viene ripetuta 3 volte. I parametri valutati riguardano l'area media del picco di ogni analita e il tempo di ritenzione.

In **Figura 33**, **34** e **Tabella 19** vengono riportati i risultati ottenuti dopo iniezione della miscela di standard in 3 colonne diverse.

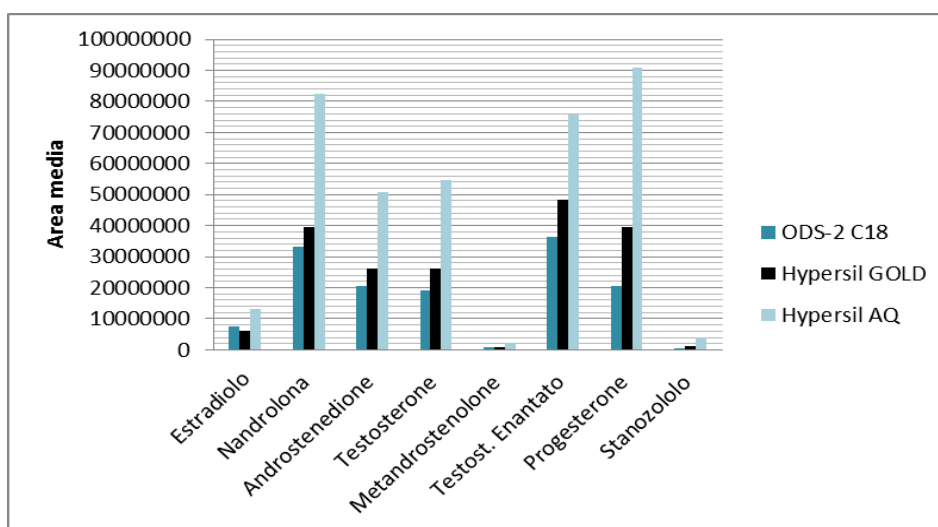


Figura 33 – Area media dei picchi associati agli analiti in esame ottenuti per iniezione in 3 colonne diverse

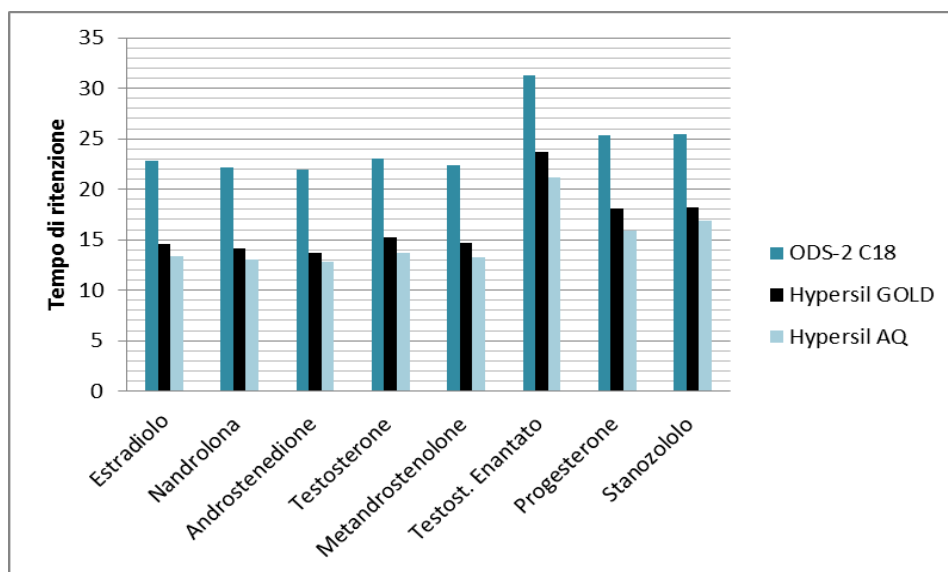


Figura 34 – Tempo di ritenzione medio (min.) ottenuto dei picchi degli analiti utilizzando tre colonne diverse per la LC

Tabella 19 – Risultati riassuntivi dell'area media dei picchi degli analiti e loro tempo di ritenzione ottenuti con le colonne provate

Analiti	Area media ODS-2 C18	Area media Hypersil GOLD	Area media Hypersil AQ	Tempo ritenzione ODS-2 C18	Tempo ritenzione Hypersil GOLD	Tempo ritenzione Hypersil AQ
Estradiolo ^	7524708	6243142	13269014	22.84	14.54	13.37
Nandrolone	33209790	39583814	82420600	22.16	14.1	13.03
Androstenedione	20608964	26285822	50780499	21.98	13.71	12.8
Testosterone	19255380	26105047	54591247	23.06	15.26	13.74
Metandrostenolone	793840	1005699	2206680	22.39	14.67	13.24
Testost. Enantato	36428297	48475444	75794968	31.25	23.73	21.16
Progesterone ^	20375925	39405938	91069390	25.36	18.1	15.87
Stanozololo	605457	1212403	4147224	25.5	18.21	16.86

^ standard interno

La colonna che è stata scelta per svolgere le analisi è la Hypersil AQ in quanto permette nella maggior parte dei casi di ottenere analisi con tempi di ritenzione più bassi e permette di ottenere picchi con aree elevate e quindi una migliore sensibilità.

5.13.2 Valutazione della procedura di estrazione

La valutazione dell'efficienza di estrazione viene valutata attraverso il confronto di 3 diversi metodi di estrazione utilizzando un bianco di matrice:

- Metodo che prevede l'utilizzo di etanolo;
- Metodo che prevede l'utilizzo di cartucce SPE C18 costituite da particelle irregolari di silice C18 fase inversa;
- Metodo che prevede l'utilizzo di cartucce SPE Retain PEP costituite da particelle sferiche di polistirene DVB funzionalizzate con gruppi ureici.

Per ulteriori dettagli sulla preparazione dei campioni vedere il paragrafo 4.7.3

Al bianco di matrice viene aggiunta una miscela di standard a tre concentrazioni diverse. I parametri valutati sono il recupero e la capacità del metodo di purificare il campione ed eliminare la presenza di possibili molecole interferenti

Nelle **Figure 35, 36 e 37** vengono illustrati i risultati ottenuti dagli analiti steroidei a tre concentrazioni diverse: 5, 0.5 e 0.1 µg/mL rispettivamente.

Nelle **Figure 38, 39 e 40** vengono riportati i tracciati cromatografici relativi alle diverse procedure di estrazione.

Dai dati riportati nelle **Figure 35, 36, 37** e in **Tabella 20** si osserva che l'estrazione con etanolo permette di avere il recupero migliore se confrontato con le procedure che utilizzano le cartucce SPE. Tuttavia, dal tracciato cromatografico in **Figura 38** si nota che il metodo comporta l'estrazione di diverse sostanze che possono interferire con il risultato finale.

L'uso invece della SPE con cartucce Retain PEP porta ad avere un recupero più basso rispetto a quello in etanolo, ma l'estratto ottenuto non presenta sostanze estranee che possono interferire con la quantificazione. Quindi la procedura che utilizza la cartuccia di purificazione Retain PEP è stata ritenuta la più adeguata.

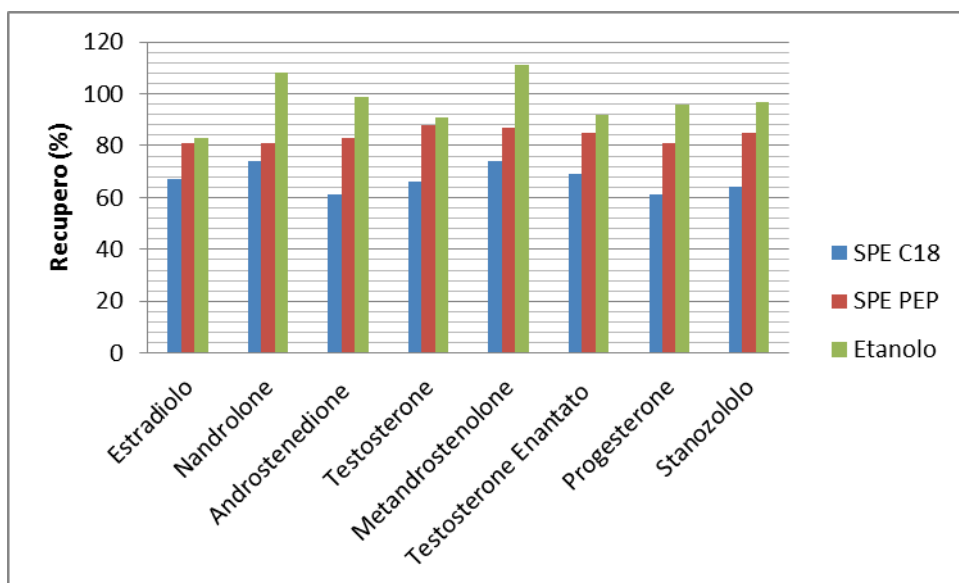


Figura 35 –Recupero percentuale ottenuto con tre procedure di estrazione diverse da matrici bianche addizionate di 5 µg/mL di analiti

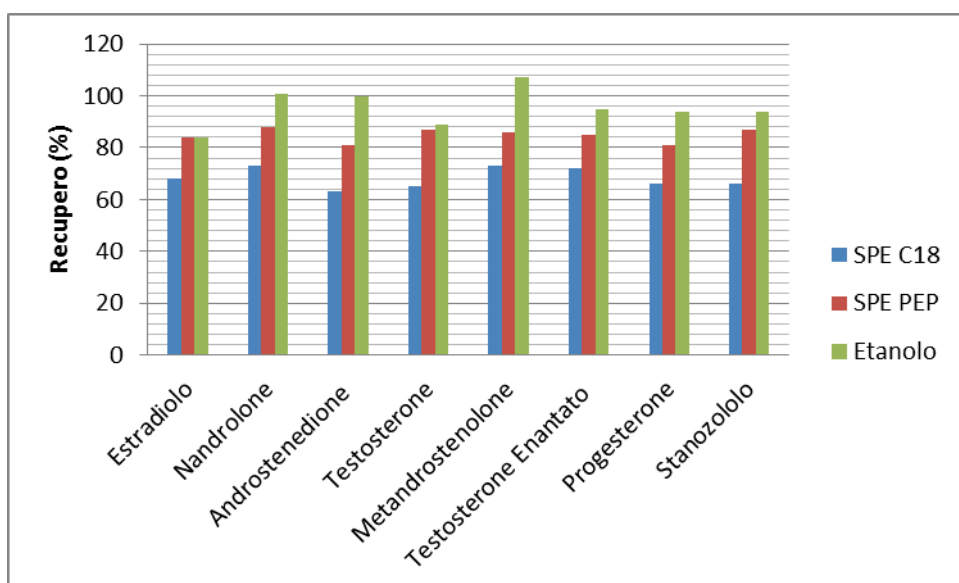


Figura 36 – Risultati del recupero ottenuto con tre procedure di estrazione da bianchi dopo aggiunta di 0.5 µg/mL di analiti

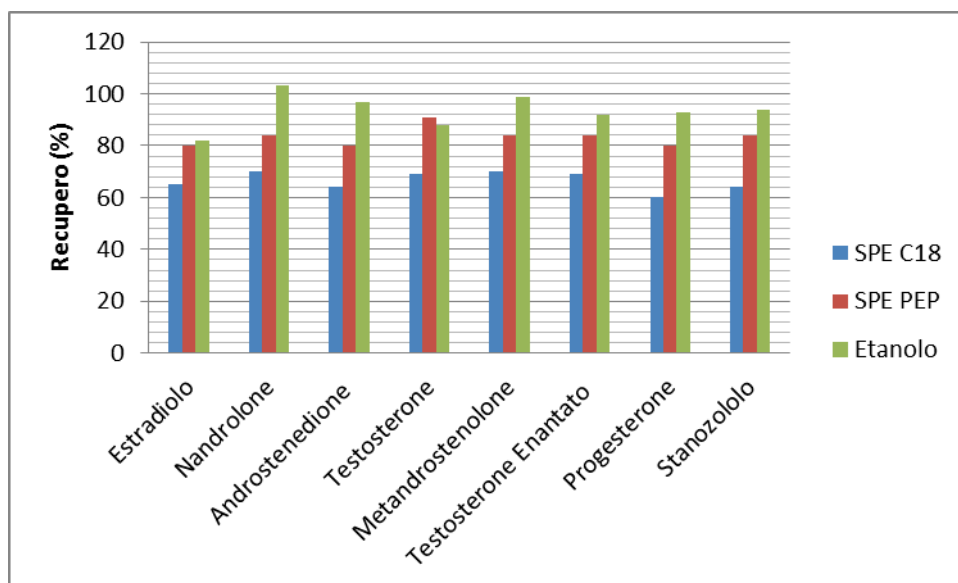


Figura 37 – Risultati del recupero ottenuto con tre procedure di estrazione da bianchi dopo aggiunta di 0.1 µg/mL di analiti

Tabella 20 – Dati riassuntivi del recupero ottenuto con i tre metodi di estrazione a tre concentrazioni diverse

Analiti	Recupero (%)	Recupero (%)	Recupero (%)	Recupero (%)	Recupero (%)	Recupero (%)	Recupero (%)	Recupero (%)	Recupero (%)
	5ng/µl	5ng/µl	5ng/µl	0.5ng/µl	0.5ng/µl	0.5ng/µl	0.1ng/µl	0.1ng/µl	0.1ng/µl
	SPE C18	SPE PEP	Etanolo	SPE C18	SPE PEP	Etanolo	SPE C18	SPE PEP	Etanolo
Estradiolo	67	81	83	68	84	84	65	80	82
Nandrolone	74	81	108	73	88	101	70	84	103
Androstenedione	61	83	99	63	81	100	64	80	97
Testosterone	66	88	91	65	87	89	69	91	88

Tabella 20 - Continuazione - Dati riassuntivi del recupero ottenuto con i tre metodi di estrazione a tre concentrazioni diverse

Analiti	Recupero (%) 5ng/μl SPE C18	Recupero (%) 5ng/μl SPE PEP	Recupero (%) 5ng/μl Etanolo	Recupero (%) 0.5ng/μl SPE C18	Recupero (%) 0.5ng/μl SPE PEP	Recupero (%) 0.5ng/μl Etanolo	Recupero (%) 0.1ng/μl SPE C18	Recupero (%) 0.1ng/μl SPE PEP	Recupero (%) 0.1ng/μl Etanolo
Metandrostenolone	74	87	111	73	86	107	70	84	99
Testosterone Enantato	69	85	92	72	85	95	69	84	92
Progesterone	61	81	96	66	81	94	60	80	93
Stanozololo	64	85	97	66	87	94	64	84	94

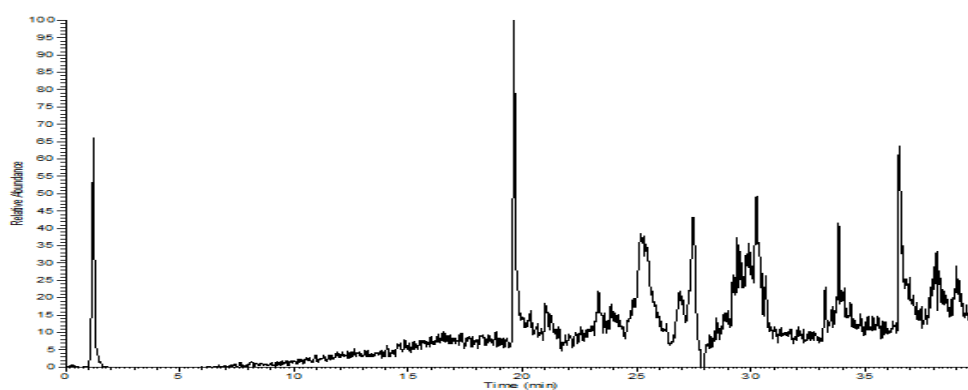


Figura 38 – LC-MS, usando il metodo total ion, di un bianco dopo aggiunta di 0.1 μg/mL degli analiti ed estrazioni in etanolo

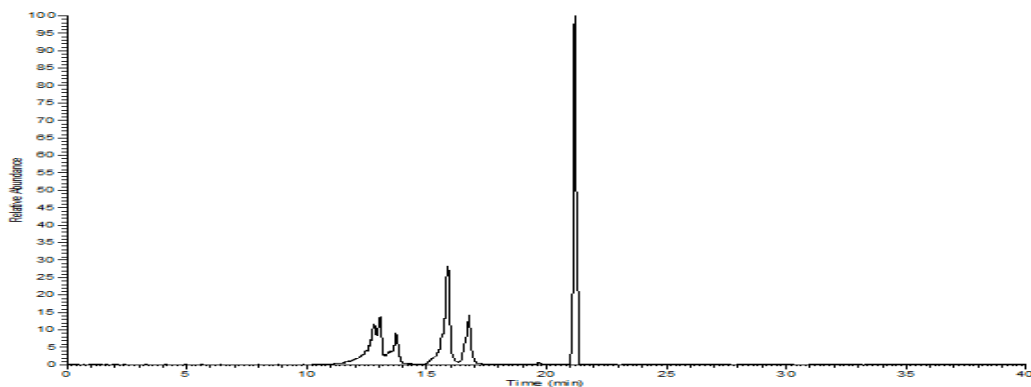


Figura 39 – LC-MS, usando il metodo total ion, di un bianco dopo aggiunta di 0.1 µg/mL degli analiti e purificazione con la cartuccia SPE Retain PEP

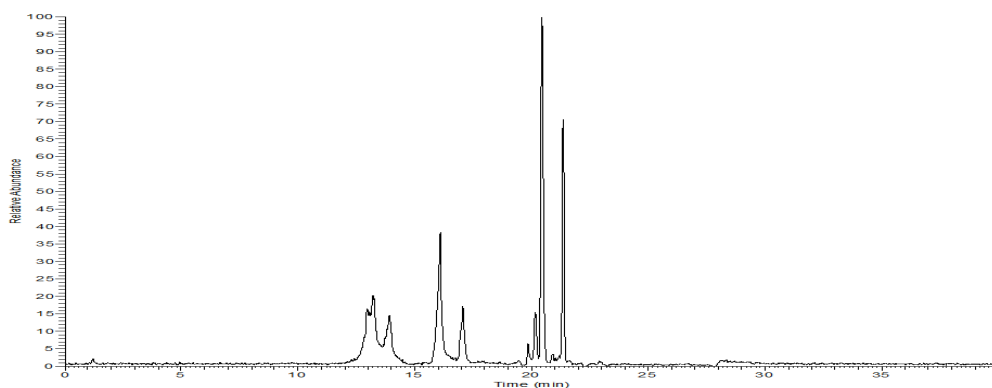


Figura 40 – LC-MS, usando il metodo total ion, di un bianco dopo aggiunta di 0.1 µg/mL degli analiti e purificazione con la cartuccia SPE C18

5.13.3 Separazione cromatografica con LC ed idoneità del sistema

I campioni analizzati in questo studio per la presenza di ormoni steroidei comprendevano 22 integratori alimentari a base di piante e 13 prodotti destinati allo sportivo.

Il problema di ottimizzare il sistema cromatografico in grado di separare i diversi analiti ricercati da altre sostanze presenti nei campioni o, separare analiti che coeluiscono mediante HPLC, è risolto con la tecnica LC/MS utilizzando il “Single Ion Monitoring” (SIM). La tecnica SIM permette di selezionare i pesi molecolari degli ioni di interesse, eliminando dal tracciato cromatografico i picchi relativi ad altre molecole con pesi molecolari diversi.

Il sistema di purificazione dei campioni usando le cartucce SPE in associazione all'utilizzo della tecnica SIM, ha permesso di eliminare possibili sostanze interferenti e di selezionare i pesi molecolari e le frammentazioni di interesse, in modo da ottenere un metodo più specifico e selettivo.

La separazione cromatografica degli standard verrà riportata nel paragrafo 4.7.11, Figure 42 – 50.

Il sistema cromatografico viene giornalmente controllato applicando un test di idoneità i cui risultati sono riportati in **Tabella 21**.

Tabella 21 – I risultati dei test di idoneità del sistema (media di 6 determinazioni)

Composto	tR (min)	$\alpha^{(1)}$	Fattore di simmetria	N° di piatti teorici
Estradiolo	13.4 ± 0.27	1	1	536
Nandrolone	13.08 ± 0.21	1	1.09	1000
Androstenedione	12.83 ± 0.25	1	1.14	315
Testosterone	13.79 ± 0.19	1	1.14	537
Metandrostenolone	13.21 ± 0.18	1	1.08	337
Test. Enantato	21.18 ± 0.29	1	1.21	3362
Progesterone	15.9 ± 0.18	1	1.23	1935
Stanozololo	16.84 ± 0.21	1	1.07	4212

¹ Fattore di separazione (α)= $(tR_2 - T_0)/(tR_1 - t_0)$ dove tR_2 e tR_1 sono i tempi di ritenzione di due picchi vicini.

5.13.4 Sensibilità

I LOD degli analiti vengono riportati in **Tabella 22**. Mentre il LOQ è risultato essere 0.1 ppm per tutti gli standard e rappresenta il punto più basso della retta di calibrazione. Le risposte al LOQ erano identificabili e riproducibili, con una precisione che variava da 7 – 17% e accuratezza del 84 - 98%, per tutti gli analiti.

Tabella 22 - Valutazione del LOD in LC/MS

Analiti	LOD (ppm)
Estradiolo ^	0.003
Nandrolone	0.003
Androstenedione	0.005
Testosterone	0.005
Metandrostenolone	0.003
Testost. Enantato	0.005
Progesterone ^	0.005
Stanozololo	0.005

^ standard interni

5.13.5 Selettività

I cromatogrammi di 6 diversi bianchi non contenevano sostanze interferenti ed è stato possibile ottenere un'alta selettività utilizzando la tecnica SIM. Gli analiti hanno mostrato uno scostamento medio dalla concentrazione nominale a livello del LLQ non superiore al 17%, non superando la variazione massima consentita di 20%.

5.13.6 Accuratezza e Precisione

I dati di analisi della prestazione sono riassunti nella **Tabella 23**. L'accuratezza del dosaggio presenta un coefficiente di variazione $\pm 16.38\%$ per tutte le concentrazioni. Mentre la precisione del within-day e between-day non supera il 17.67% per tutti gli analiti.

Tabella 23 – Dati di prestazione riferiti all'accuratezza e precisione del saggio per gli steroidi

Concentrazione nota (ppm)	Concentrazione media misurata (ppm) (media \pm DS)	Acuratezza (%)	Precisione Within-day (%RSD)	Precisione Between-day (%RSD)
Estradiolo				
0.1	0.119 (± 0.017)	116.38	14.7	15.88
0.5	0.551 (± 0.038)	110.29	7.18	8.98
5	5.495 (± 0.406)	109.9	7.39	9.02

Tabella 23 - *Continuazione* - Dati di prestazione riferiti all'accuratezza e precisione del saggio per gli steroidi

Concentrazione nota (ppm)	Concentrazione media misurata (ppm) (media \pm DS)	Acuratezza (%)	Precisione Within-day (%RSD)	Precisione Between-day (%RSD)
Nandrolone				
0.1	0.109 (± 0.017)	109.39	16.07	16.98
0.5	0.539 (± 0.052)	107.97	9.71	10.63
5	5.240 (± 0.403)	104.81	7.76	7.45
Androstenedione				
0.1	0.085 (± 0.012)	85.38	14.53	16.07
0.5	0.447 (± 0.027)	89.39	6,35	8.98
5	4.671 (± 0.177)	93.43	3.78	5.61
Testosterone				
0.1	0.091 (± 0.007)	91.02	8.04	10.06
0.5	0.467 (± 0.039)	93.34	8.28	9.78
5	4.833 (± 0.221)	96.6	4.59	5.27
Metandrostenolone				
0.1	0.084 (± 0.014)	84.20	16.6	17.67
0.5	0.446 (± 0.035)	89.21	7.96	8.42
5	4.601 (± 0.242)	92.02	5.26	5.98
Testosterone Enantato				
0.1	0.112 (± 0.008)	111.98	7.66	9.5
0.5	0.542 (± 0.034)	108.39	6.46	7.89
5	5.212 (± 0.331)	104.24	6.36	8.83
Progesterone				
0.1	0.129 (± 0.013)	116.29	10.24	12.65
0.5	0.635 (± 0.038)	109.03	5.96	6.38
5	6.094 (± 0.301)	111.85	4.8	6.01
Stanozololo				
0.1	0.096 (± 0.003)	91.85	11.89	13.57
0.5	0.465 (± 0.036)	93.10	7.8	8.1
5	4.788 (± 0.323)	95.76	6.75	7.52

4.13.7 Recupero

I risultati del recupero utilizzando il metodo di purificazione con la SPE Retain PEP sono stati precedentemente illustrati in **Tabella 20**. Il range ottenuto è stato di 80 – 91% per tutti gli analiti nelle 3 concentrazioni testate (0.1, 0.5 e 5 µg/mL).

5.13.8 Linearità

Il saggio è risultato lineare per tutti gli analiti nell'intervallo di concentrazioni 0.1 - 5 µg/mL. Le rette di calibrazione, i coefficienti medi di correlazione (R^2) e i parametri delle funzioni di regressione lineare sono riportati in **Figura 41**. Le rette di calibrazione sono state ottenute con l'utilizzo di 6 punti, includendo un bianco e un LOQ.

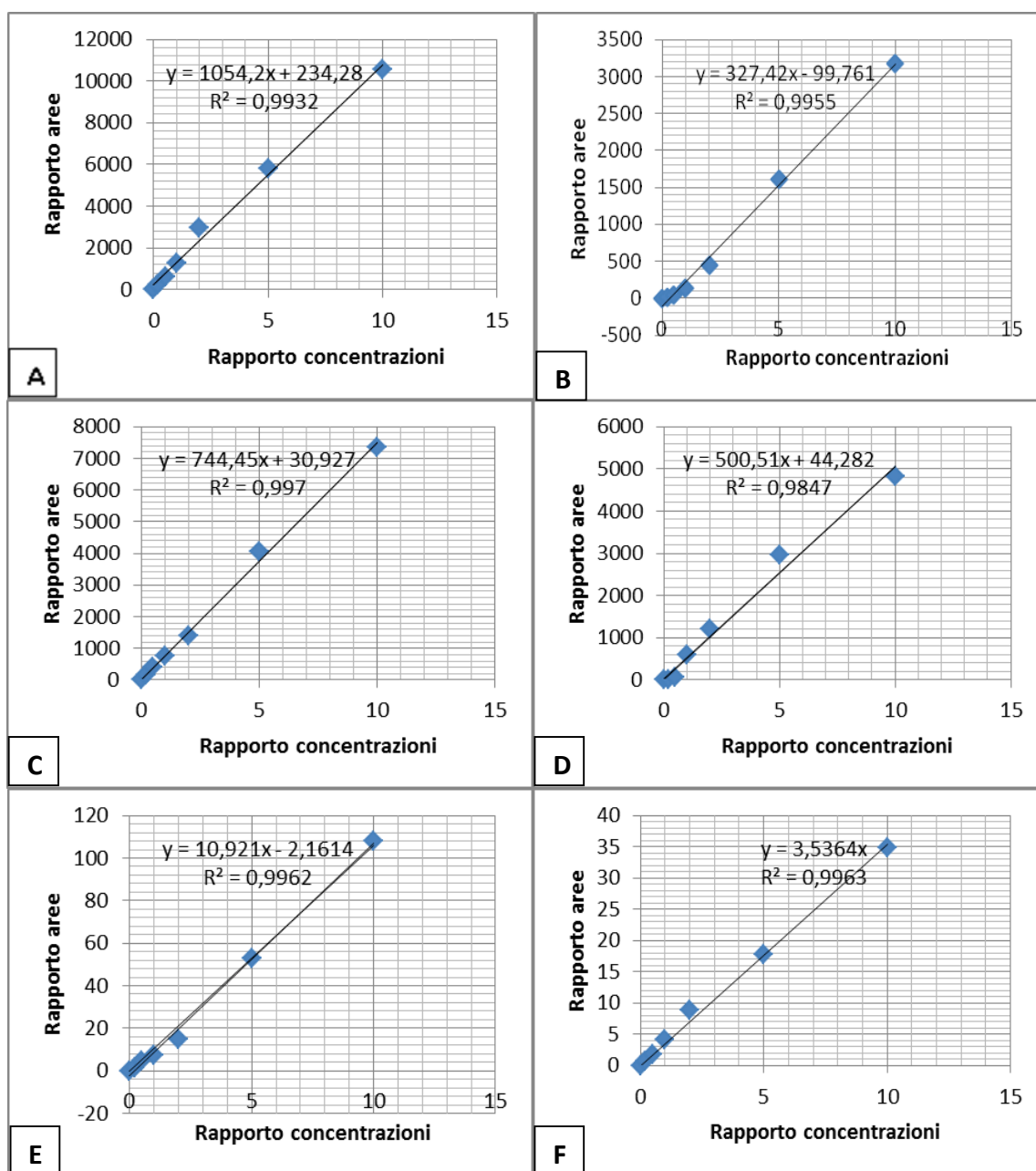


Figura 41 – Rette di calibrazione del nandrolone (A), androstenedione (B), testosterone (C), metandrostenolone (D), testosterone enantato (E) e stanozololo (F), ottenuti da campioni addizionati ed estratti

5.13.9 Stabilità

Le prove effettuate a breve e lungo termine hanno dimostrato la stabilità degli analiti conservati in una soluzione di metanolo-acqua 1:1 (v/v) e in un bianco. Inoltre, prove di stabilità di congelamento/scongelamento hanno mostrato che gli analiti sono stabili almeno per tre cicli. I risultati delle prove sono descritti in **Tabella 24**.

Tabella 24 – Dati della stabilità degli analiti in differenti condizioni

Condizioni	Analita	Matrice	Concentraz. iniziale misurata (µg/mL)	Concentrazione media (µg/mL)	DS (µg/mL)	RSD (%)
Temperatura ambiente, 8 h	Estradiolo	MeOH-H2O 1:1	0.113	0.109	0.008	13.67
			5.328	5.259	0.271	6.68
	Nandrolone	MeOH-H2O 1:1	0.108	0.112	0.012	14.77
			5.198	5.230	0.394	6.92
	Androstenedione	MeOH-H2O 1:1	0.092	0.088	0.009	13.06
			4.756	4.798	0.154	2.98
	Testosterone	MeOH-H2O 1:1	0.095	0.093	0.006	6.31
			4.949	4.883	0.164	3.07
	Metandrostenolone	MeOH-H2O 1:1	0.087	0.085	0.01	15,29
			4.840	4.786	0.207	5.26
	Test.Enantato	MeOH-H2O 1:1	0.109	0.111	0.005	7.12
			5.106	5.158	0.208	5.49
	Progesterone	MeOH-H2O 1:1	0.123	0.119	0.01	8.29
			5.857	5.804	0.294	3.73
	Stanozololo	MeOH-H2O 1:1	0.095	0.091	0.007	10.67
			4.896	4.804	0.302	5.91
-20°C, 1 mese	Estradiolo	MeOH-H2O 1:1	0.113	0.106	0.01	10.98
			5.328	5.248	0.284	7.08
	Nandrolone	MeOH-H2O 1:1	0.108	0.105	0.011	13.57
			5.198	5.187	0.294	7.06
	Androstenedione	MeOH-H2O 1:1	0.092	0.09	0.008	11.79
			4.756	4.761	0.186	3.4
	Testosterone	MeOH-H2O 1:1	0.095	0.097	0.011	7.05
			4.949	4.905	0.206	2.86
	Metandrostenolone	MeOH-H2O 1:1	0.087	0.09	0.006	16,09
			4.840	4.829	0.236	4.89

Tabella 24 - Continuazione - Dati della stabilità degli analiti in differenti condizioni

Condizioni	Analita	Matrice	Concentraz. iniziale misurata (µg/mL)	Concentrazione media (µg/mL)	DS (µg/mL)	RSD (%)
-20°C, 1 mese	Test.Enantato	MeOH- H2O 1:1	0.109	0.101	0.012	6.78
			5.106	5.045	0.256	5.05
	Progesterone	MeOH- H2O 1:1	0.123	0.111	0.009	7.65
			5.857	5.868	0.294	4.03
	Stanozololo	MeOH- H2O 1:1	0.095	0.088	0.009	9.12
			4.896	4.878	0.298	4.65
Temperatura ambiente, 8 h	Estradiolo	Bianco	0.189	0.176	0.017	15.04
			5.371	5.298	0.281	8.12
	Nandrolone	Bianco	0.110	0.102	0.009	15.08
			5.176	5.149	0.387	5.42
	Androstenedione	Bianco	0.097	0.094	0.013	13.87
			4.836	4.805	0.181	2.04
	Testosterone	Bianco	0.091	0.089	0.01	7.4
			4.949	4.906	0.207	4.02
	Metandrostenolone	Bianco	0.090	0.082	0.012	14,63
			4.838	4.801	0.238	9.81
	Test. Enantato	Bianco	0.112	0.116	0.01	6.43
			5.201	5.238	0.286	6.21
	Progesterone	Bianco	0.112	0.106	0.015	9.69
			5.691	5.702	0.221	3.24
	Stanozololo	Bianco	0.097	0.092	0.009	9.93
			4.910	4.892	0.298	4.27
-20°C, 1 mese	Estradiolo	Bianco	0.189	0.182	0.005	10.68
			5.371	5.278	0.372	6.92
	Nandrolone	Bianco	0.110	0.097	0.007	13.94
			5.176	5.086	0.285	3.71
	Androstenedione	Bianco	0.097	0.106	0.006	11.38
			4.836	4.906	0.087	3.31
	Testosterone	Bianco	0.091	0.098	0.013	5.24
			4.949	4.953	0.23	1.92
	Metandrostenolone	Bianco	0.090	0.099	0.008	13.92
			4.838	4.847	0.189	4.67
	Test. Enantato	Bianco	0.112	0.107	0.011	5.81
			5.201	5.173	0.256	3.04

Tabella 24 - Continuazione - Dati della stabilità degli analiti in differenti condizioni

Condizioni	Analita	Matrice	Concentraz. iniziale misurata (µg/mL)	Concentrazione media (µg/mL)	DS (µg/mL)	RSD (%)
-20°C, 1 mese	Progesterone	Bianco	0.112	0.119	0.006	8.74
			5.691	5.71	0.171	2.39
	Stanozololo	Bianco	0.097	0.104	0.01	10.49
			4.910	4.926	0.307	2.94
3 cicli di congelamento (-20°C) /scongelamento	Estradiolo	Bianco	0.189	0.195	0.011	15.04
			5.371	5.401	0.281	5.7
	Nandrolone	Bianco	0.110	0.108	0.006	11.88
			5.176	5.159	0.261	2.78
	Androstenedione	Bianco	0.097	0.108	0.011	9.03
			4.836	4.841	0.201	1.56
	Testosterone	Bianco	0.091	0.098	0.014	6.6
			4.949	5.056	0.389	2.98
	Metandrostenolone	Bianco	0.090	0.096	0.007	12.67
			4.838	4.907	0.301	7.96
	Test. Enantato	Bianco	0.112	0.102	0.01	7.92
			5.201	5.163	0.259	4.28
	Progesterone	Bianco	0.112	0.102	0.008	8.57
			5.691	5.663	0.289	4.28
	Stanozololo	Bianco	0.097	0.091	0.005	8.98
			4.910	4.897	0.238	5.46

4.13.10 Indagini dei campioni in LC/MS

A seguito delle analisi preliminari in TLC, si è proceduto alla conferma della presenza degli steroidi mediante l'utilizzo della tecnica di LC-MS.

4.13.11 Analisi degli standard

I parametri di analisi per ciascuno standard (compresi quelli degli standard interni) sono elencati in **Tabella 25**.

Tabella 25 – Parametri caratteristici degli standard di steroidi analizzati

Steroidi	Tempo di ritenzione (min)	Ione molecolare (m/z)	Figura
Estradiolo	13.37	255	Figura 42
Progesterone	15.87	315	Figura 43
Nandrolone	13.03	275	Figura 44
Androstenedione	12.80	287	Figura 45
Testosterone	13.74	289	Figura 46
Metandrostenolone	13.25	301	Figura 47
Testosterone enantato	21.15	401	Figura 48
Stanozololo	16.86	329	Figura 49

I cromatogrammi relativi all'estradiolo e al progesterone (utilizzati come standard interni) e agli standard di steroidi disponibili sono illustrati nelle **Figure 42 - 50**.

Le varie figure illustrano i cromatogrammi degli steroidi separati mediante cromatografia liquida (pannello superiore) e lo spettro di massa dello ione molecolare di ogni analita (SIM) da cui si osserva la frammentazione (pannello inferiore). L'estradiolo (**Figura 42**) ha tempo di ritenzione di circa 13 minuti e lo ione molecolare di riferimento ha massa 255. Per il progesterone (**Figura 43**) il tempo di ritenzione è di circa 16 minuti e lo ione molecolare di riferimento ha massa 315. Analogamente, i cromatogrammi e gli spettri di MS² degli analiti ricercati sono illustrati nelle **Figure 42 - 50**.

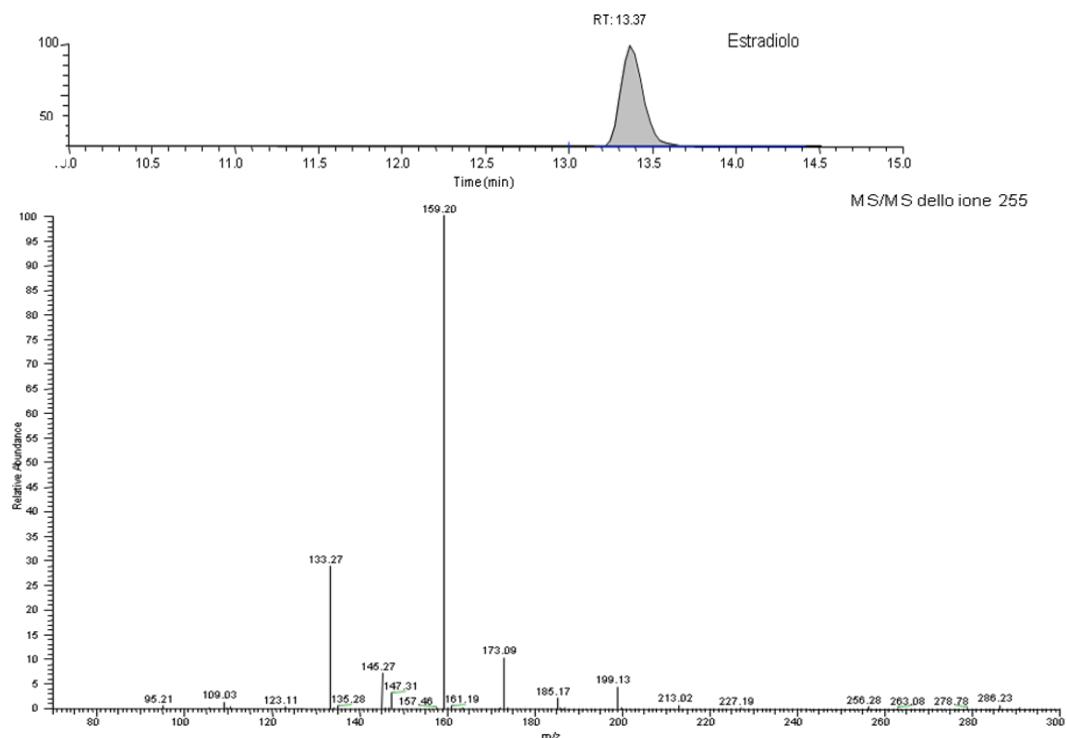


Figura 42 – Cromatogramma in LC (pannello superiore) e spettro di MS² (pannello inferiore) relativi all'estradiolo, utilizzato come standard interno

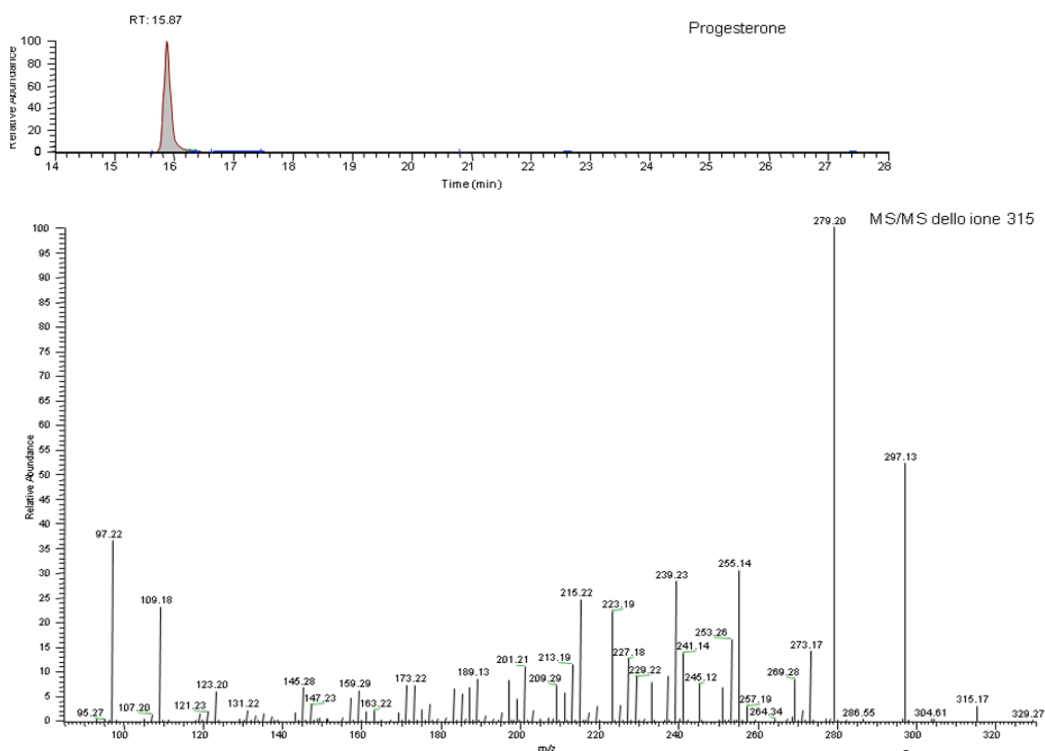


Figura 43 – Cromatogramma in LC (pannello superiore) e spettro di MS² (pannello inferiore) relativi al progesterone, utilizzato come standard interno

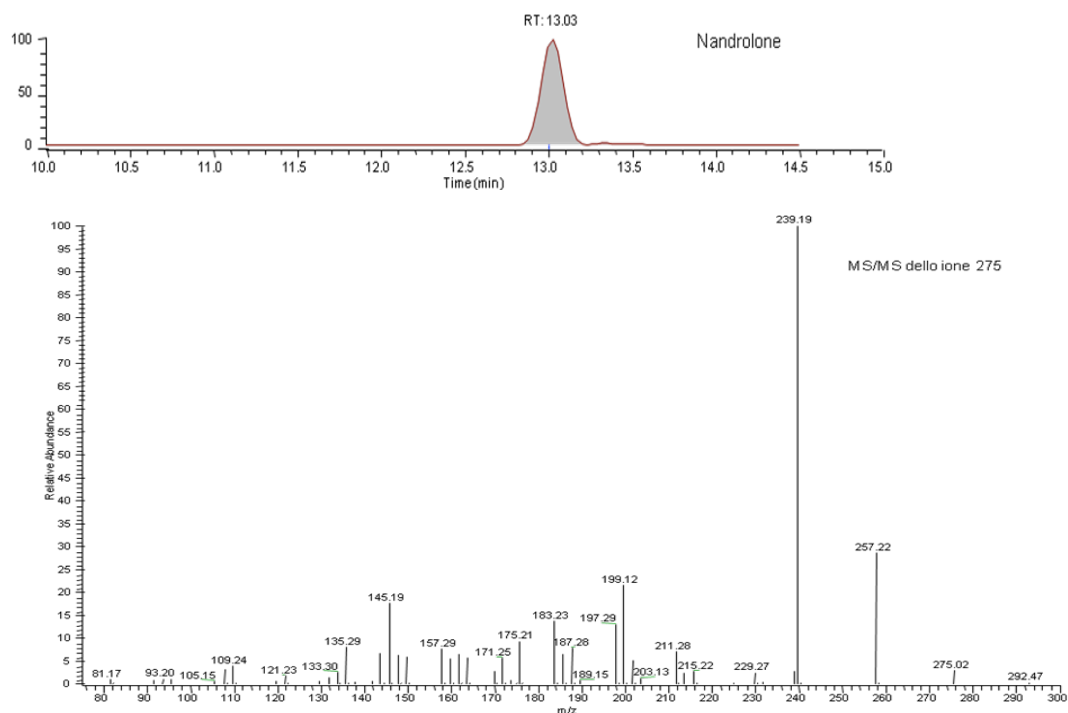


Figura 44 – Cromatogramma in LC (pannello superiore) e spettro di MS^2 (pannello inferiore) relativi al nandrolone

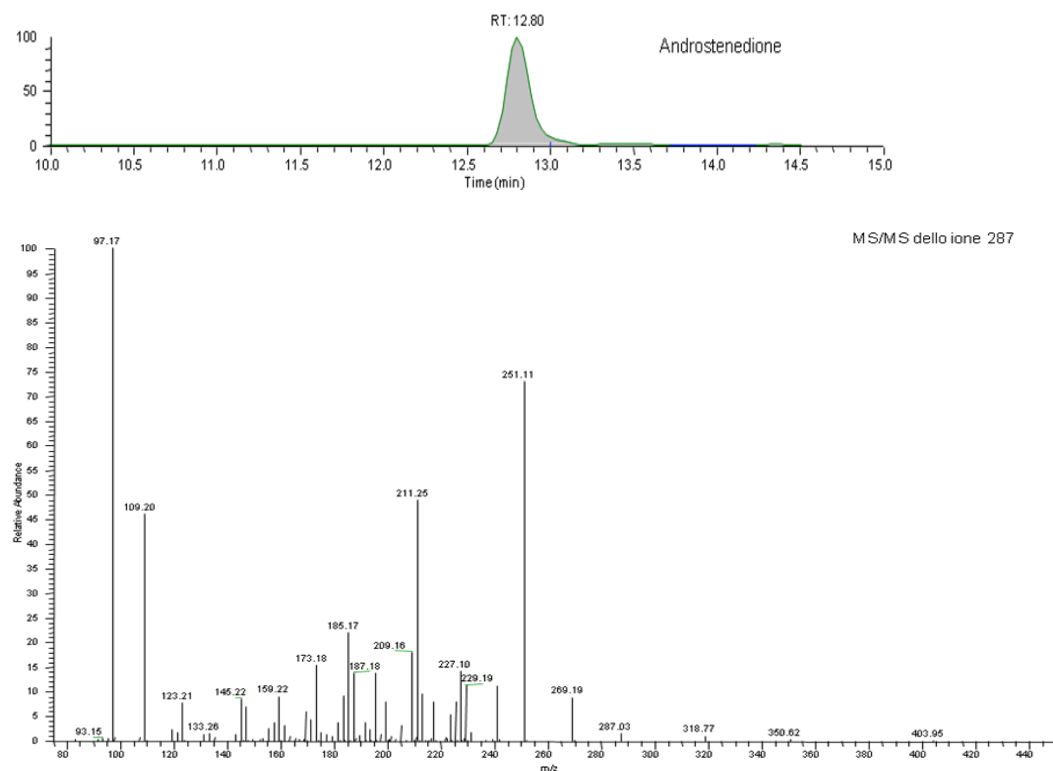


Figura 45 – Cromatogramma in LC (pannello superiore) e spettro di MS^2 (pannello inferiore) relativi all'androstenedione

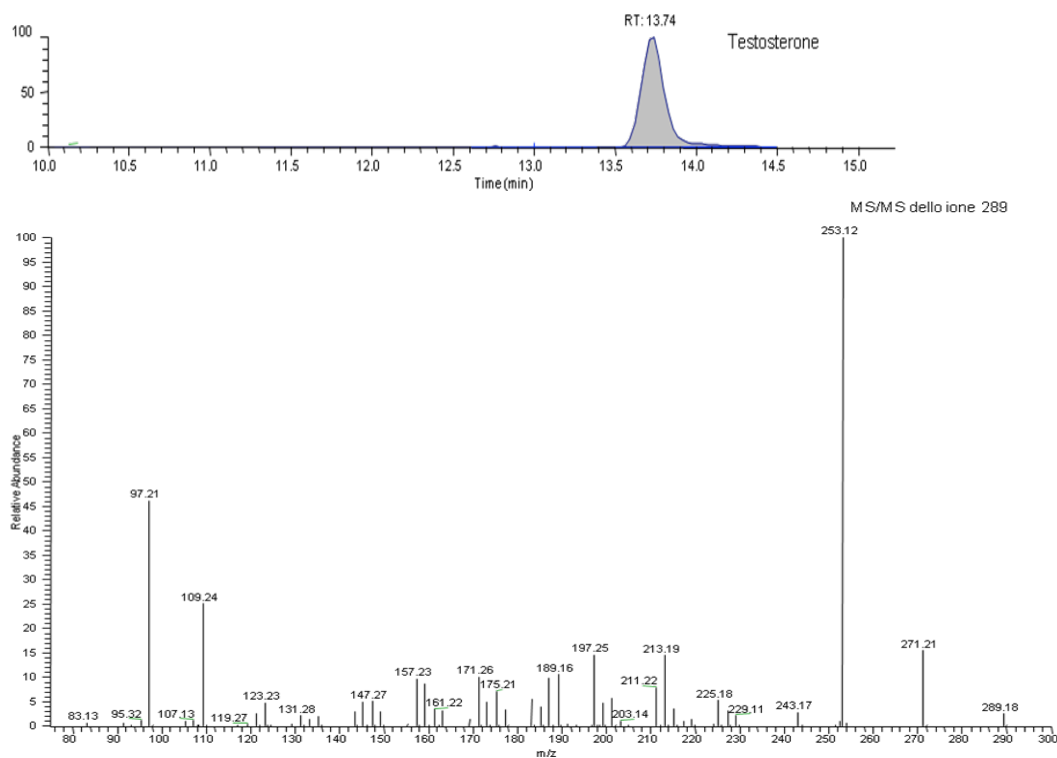


Figura 46 – Cromatogramma in LC (pannello superiore) e spettro di MS^2 (pannello inferiore) relativi al testosterone

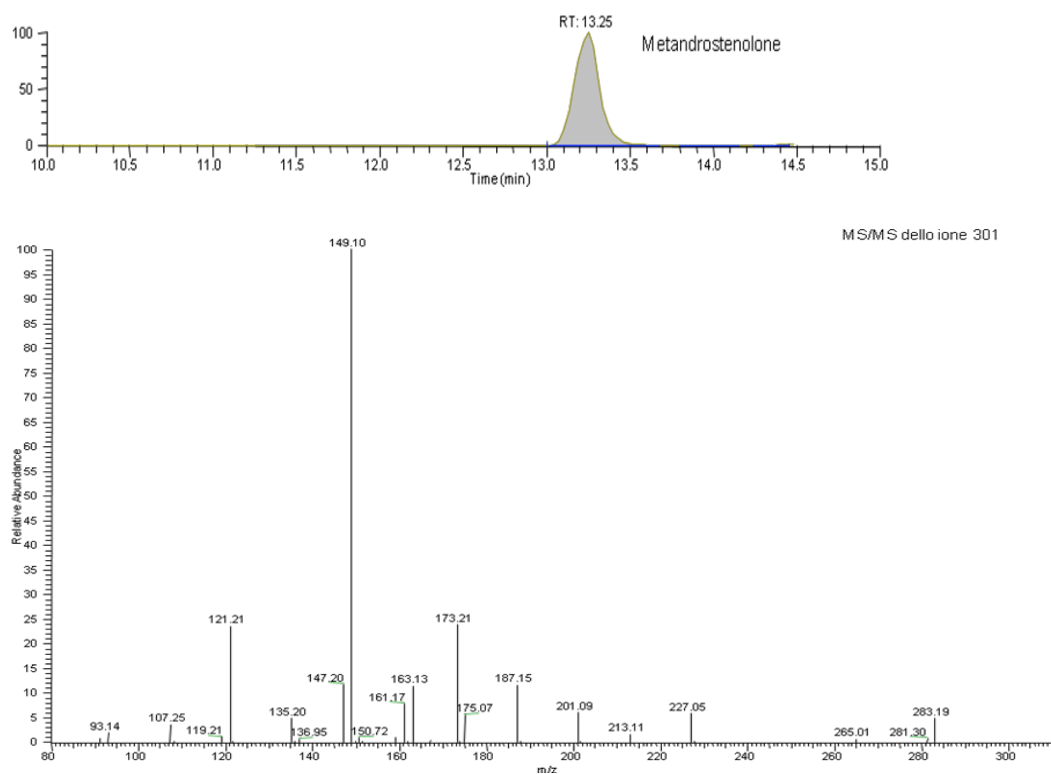


Figura 47– Cromatogramma in LC (pannello superiore) e spettro di MS^2 (pannello inferiore) relativi al metandrostenolone

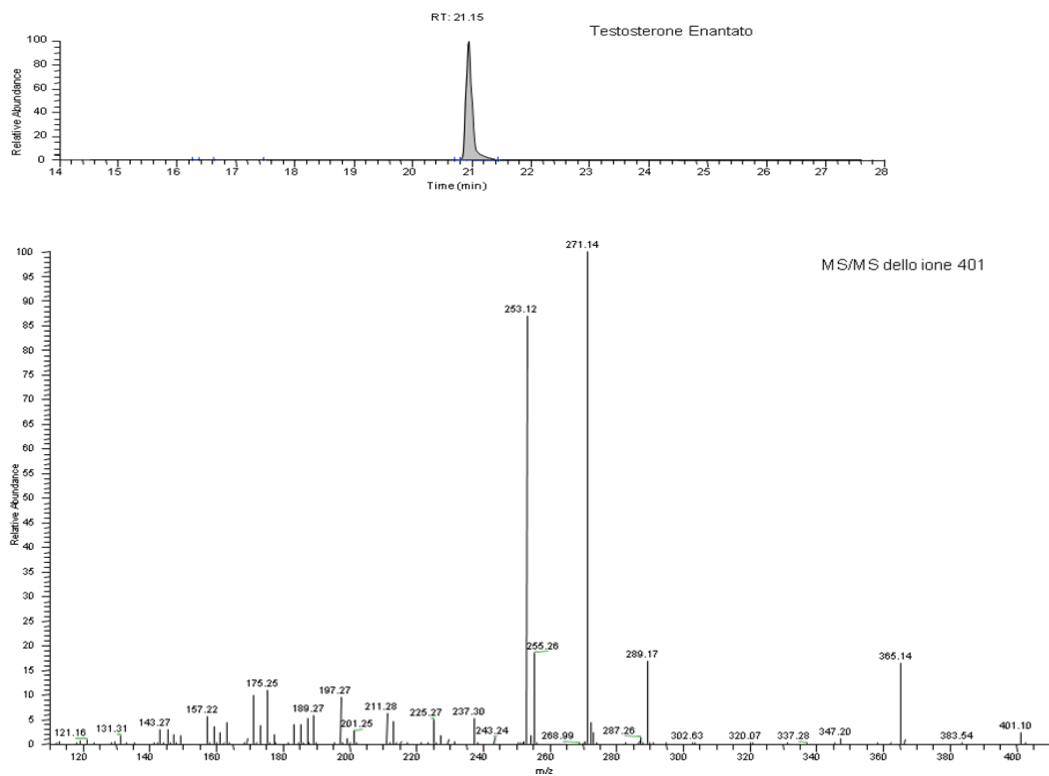


Figura 48 – Cromatogramma in LC (pannello superiore) e spettro di MS² (pannello inferiore) relativi al testosterone enantato

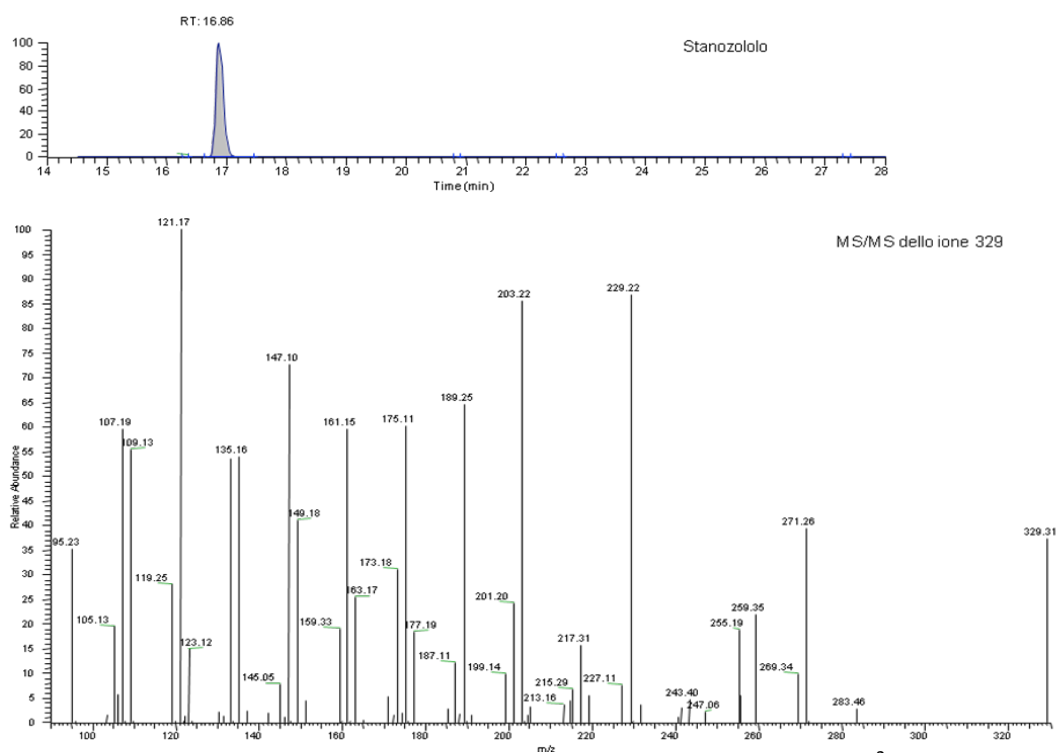


Figura 49 – Cromatogramma in LC (pannello superiore) e spettro di MS² (pannello inferiore) relativi allo stanozololo

5.13.12 Analisi dei Campioni in LC-MS

Tre aliquote di ogni campione, trattato come descritto in Metodi, sono state estratte e in seguito iniettate in LC-MS (25 µL).

In **Figura 50** è illustrato a titolo di esempio il cromatogramma del campione n° 23 ottenuto per LC (pannello superiore) e il relativo spettro di MS^2 (pannello inferiore) del composto nandrolone presenti nel campione che ha tempo di ritenzione di 13 minuti.

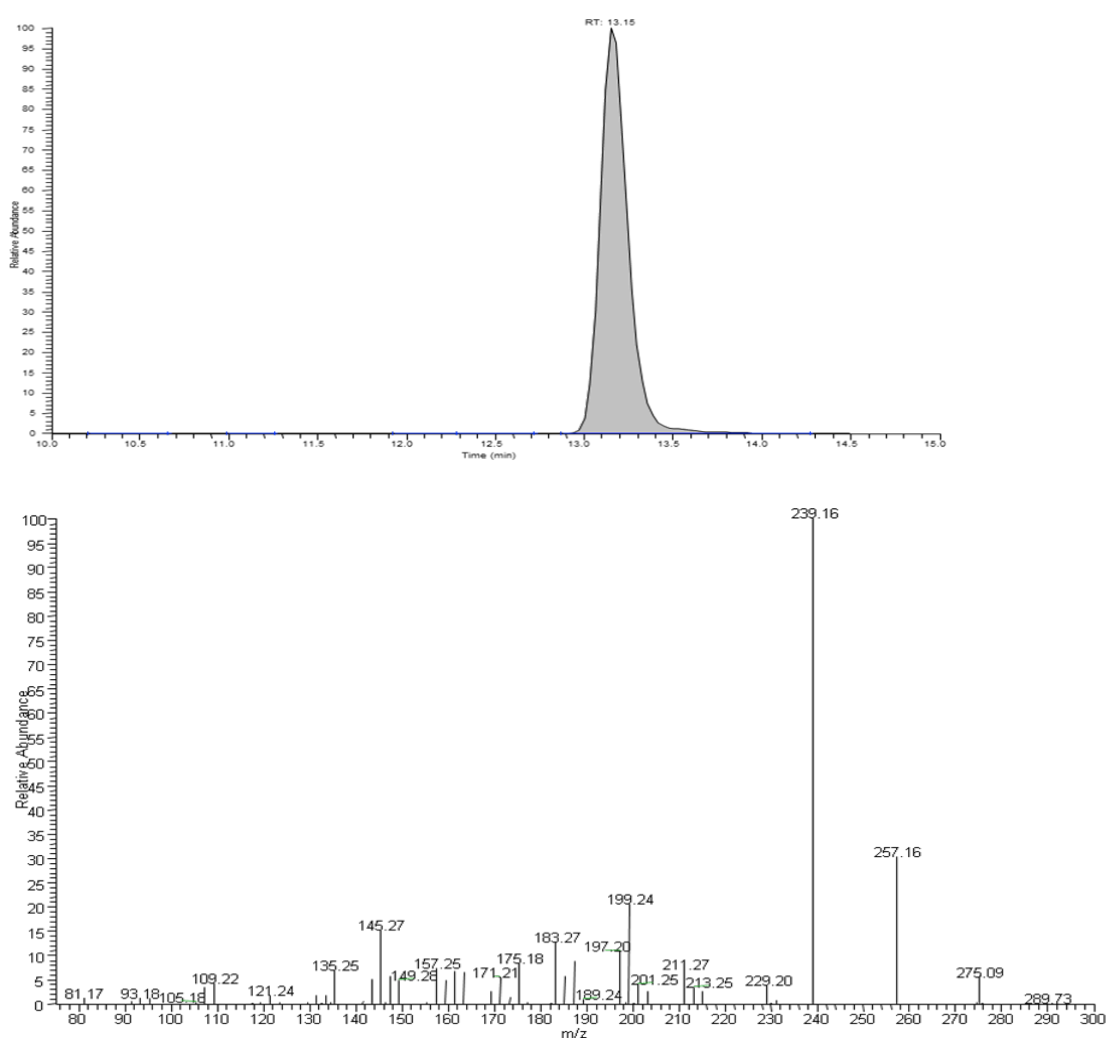


Figura 50 – Cromatogramma in LC (pannello superiore) e spettro di MS^2 (pannello inferiore) relativi al composto nandrolone rilevato nel campione n° 23

5.14 RISULTATI GENERALI E DISCUSSIONE

La **Tabella 26** elenca il riassunto dei risultati ottenuti dalla individuazione degli analiti in TLC e conferma della presenza e quantificazione attraverso LC/MS nei 35 campioni analizzati.

Tabella 26 – Risultati generali dei saggi dei 35 campioni

Campione Nro	Positività in TLC	Presenza confermata da LC/MS	Quantitativo calcolato da LC (ppm)
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-

Tabella 26 - Continuazione - Risultati dei saggi dei 35 campioni

Campione Nro	Positività in TLC	Presenza confermata da LC/MS	Quantitativo calcolato da LC (ppm)
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	Nandrolone e Test. Enantato	Nandrolone	0.77
24	-	-	-
25	Test. Enantato	Test. Enantato	9000
26	Test. Enantato	Test. Enantato	2900
27	-	-	-
28	Stanozololo	Stanozololo	1900
29	Stanozololo	Stanozololo	20
30	Testosterone e Test. Enantato	Testosterone	60
		Test.Enantato	2100
31	Deidroepiandrosterona	-	-
32	Stanozololo	Stanozololo	116000
33	-	-	-
34	-	-	-
35	-	-	-

La presenza di steroidi è stata rilevata in 8 campioni (n° 23, 25, 26, 28, 29, 30, 31 e 32). Questi erano tutti integratori alimentari che non contengono estratti di pianta nella loro composizione.

In 2 di questi prodotti la presenza degli steroidi rivelati era stata dichiarata in etichetta:

- campione numero 32 dichiarava la presenza di stanozololo equivalente a quanto quantificato da LC;

- campione numero 31 dichiarava la presenza di deidroepiandrosterone.

In 6 prodotti, invece, la presenza di steroidi non era stata dichiarata in etichetta e quindi si può ipotizzare un'aggiunta intenzionale.

Tra i campioni analizzati quelli che hanno mostrato positività durante le prove analitiche sono di provenienza sconosciuta, tranne il campione n 31 che proviene dagli Stati Uniti

6. CONCLUSIONI

L'elevato numero di composti da ricercare nei campioni inclusi nello studio ha diretto la scelta verso tecniche analitiche efficaci ed allo stesso tempo veloci in modo da ottenere risultati rapidi, comprensibili e con sensibilità sufficiente per trovare le sostanze di interesse. Durante questo lavoro è stato possibile mettere a punto e validare tecniche analitiche che hanno permesso di valutare il contenuto di ammine ed ormoni steroidei in matrici complesse. Le difficoltà riscontrate, a causa delle caratteristiche dei campioni analizzati, sono state risolte con l'utilizzo di metodi di purificazione adeguati e con l'utilizzo di rivelatori più specifici e sensibili.

Alla luce dei dati ottenuti, questo studio mette in evidenza l'importanza della corretta etichettatura dei prodotti ad uso di integratori alimentari in base ai numerosi casi di sofisticazione da noi evidenziati in cui è stata rilevata una discrepanza tra quanto riportato in etichetta e l'effettivo contenuto di principi attivi del preparato. Tra i differenti integratori alimentari, sono più a rischio di abuso quelli che favoriscono la perdita di peso o che vengono impiegati per migliorare le prestazioni sportive. In questi prodotti possono essere presenti composti stimolanti, sia come componenti naturali sia come ingredienti addizionati. La conoscenza della reale composizione degli integratori alimentari è sicuramente importante per un uso corretto da parte del consumatore e degli atleti.

In un campione si è osservato che il contenuto di sinefrina era presente in quantitativi superiori a quelli ammessi dalla normativa Italiana, ovvero 42 mg/giorno contro 30 mg/giorno. Inoltre, una grande percentuale di campioni (25%) aveva quantitativi di sinefrina non conformi con quello dichiarato in etichetta. In questi prodotti, provenienti soprattutto dagli Stati Uniti d'America, la presenza dell'ammina o non veniva dichiarata oppure la quantità misurata era dal 35-110% superiore alla quantità dichiarata in etichetta. L'octopamina individuata in 3 campioni, sembrerebbe associata ad adulterazione solo in un campione, mentre negli altri casi il quantitativo è giustificabile dalla presenza naturale della octopamina nel *C. aurantium*. È importante evidenziare che l'octopamina è vietata in Italia e quindi, nonostante i quantitativi individuati in alcuni campioni siano bassi e compatibili a quelli presenti naturalmente nell'estratto della pianta, i prodotti vanno considerati (almeno per il momento) non conformi con la legislazione Italiana. Gli integratori contenenti questa ammina provengono soprattutto

dagli Stati Uniti dove l'octopamina non è vietata e si è osservato che per l'immissione in commercio in Italia l'etichetta americana era stata coperta dall'etichetta Italiana che non riportava la sua presenza. Inoltre, la presenza di efedrina in 6 campioni sorprende in quanto questo principio attivo si associa quasi esclusivamente a piante del genere *Ephedra*, o comunque a vegetali il cui uso negli integratori è vietato.

Considerando gli ormoni steroidei, questi sono stati individuati in 8 integratori alimentari che non contenevano preparati vegetali nella loro composizione e solo 2 di questi dichiaravano in etichetta la presenza dell'ormone. Il quantitativo individuato potrebbe essere associato o ad aggiunta intenzionale o a controlli inadeguati. Otto campioni sono di origine sconosciuta mentre uno è proveniente dagli Stati Uniti.

In nessuno dei campioni analizzati a base di piante è stata riscontrata la presenza di ormoni steroidei. Invece per le ammine non sorprende che i possibili effetti avversi possano essere attribuiti alla presenza di molecole stimolanti come la sinefrina, octopamina, caffeina ed efedrina. L'aspetto più pericoloso, tuttavia è rappresentato dal reale contenuto globale di queste ammine che potrebbe superare le dosi minime responsabili di un'attività farmacologica, con conseguente aumento della probabilità di insorgenza di effetti avversi.

L'uso di ingredienti botanici e di prodotti a base di esse è sempre più diffuso in Italia. Tali prodotti sono generalmente assunti per automedicazione, spesso nell'errata convinzione che l'origine naturale sia garanzia di sicurezza. Al contrario, l'uso di prodotti erboristici può essere fonte di effetti avversi dovuti alla qualità delle materie impiegate, al loro uso in concomitanza con farmaci di sintesi o alla loro assunzione in particolari stati fisiologici quali la gravidanza e l'allattamento. È necessario quindi monitorare l'utilizzo dei prodotti erboristici, evidenziarne le possibili reazioni avverse e informarne il personale sanitario, al fine di educare l'utente ad un migliore utilizzo degli stessi.

Proprio perché molti derivati di piante contengono diversi principi attivi che possono causare effetti collaterali, ci dovrebbe essere una maggiore informazione sui reali benefici e sui rischi su alcuni di questi prodotti. È anche evidente che la scelta di questi preparati dovrebbe ricadere su quelli provenienti da aziende che hanno sviluppato esperienze nel settore, che si servono di fornitori accreditati e che siano in grado di assicurare e certificare la reale composizione dei prodotti, garantendo anche i requisiti di qualità e sicurezza e il rispetto delle norme di buona preparazione.

BIBLIOGRAFIA

Abourashed EA, El-alfy A, Khan IA, Walker L. (2003). Ephedra in perspective - a current review. *Phytother Res* 17: 703-12.

Aiello M. (2004). *Viaggio nello sport attraverso i secoli*. Le Monnier-Firenze, p.306.

AIIPA - Associazione Italiana Industrie Prodotti Alimentari. (2011). Integratori alimentari e ruolo negli stili di vita. Disponibile su: http://www.integratoriebenessere.it/integrazione_alimentare/integratori-alimentari-e-ruolo-negli-stili-di-vita_1_1.htm. Ultima consultazione 08-7-2012.

Albanesi A. (1971). Tutela sanitaria delle attività sportive in rivista di diritto sportivo. *Riv Dir Spor* p.394.

Angell M, Kassirer, JP. (1998). Alternative medicine - the risks of untested and unregulated remedies. *N Engl J Med* 339: 839-41.

Astrup A, Breum L, Toubro S, Hein P, Quaade F. (1992). The effect and safety of an ephedrine/cafeine compound compared to ephedrine, caffeine and placebo in obese subjects on an energy restricted diet. A double blind trial. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16: 269-77.

Astrup A, Breum L, Toubro S. (1995). Pharmacological and clinical studies of ephedrine and other thermogenic agonists. *Obesity Res* 3: 537-40.

Astrup A, Toubro S. (1993). Thermogenic, metabolic, and cardiovascular responses to ephedrine and caffeine in man. *Int J Obes Relat Metab Disord* 17: 41-3.

Baum NY. (1987). Treatment of impotence. Nonsurgical methods. *Postgrad Med* 81: 133-6.

Becker C, Hamon M, Benoliel JJ. (1999). Prevention by 5-HT_{1A} receptor agonists of restraint stress - and yohimbine-induced release of cholecystokinin in the frontal cortex of the freely moving rat. *Neuropharmacology* 38: 525-32.

Berlin I, Crespo-Laumonier B, Cournot A. (1991). The alpha-2-adrenergic receptor antagonist yohimbine inhibits epinephrine-induced platelet aggregation in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 49: 362-9.

Berlin I, Warot D, Aymard G, Acquaviva E, Legrand M, Labarthe B, Peyron I, Diquet B, Lechat P. (2001). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of single nasal (5 mg and 10 mg) and oral (50 mg) doses of ephedrine in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 57: 447-55.

Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, Hall T, Riggins CW, Rister RS, Eds. Klein S, Rister RS. (1998). *The Complete German Commission E Monographs - Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. American Botanical Council-Austin, TX (USA), p.476.

Bouchard NC, Howland MA, Greller HA, Hoffman RS, Nelson LS. (2005). Ischemic stroke associated with use of an ephedra-free dietary supplement containing synephrine. *Mayo Clin Proc* 80: 541-5.

Brooks SM, Sholiton LJ, Werk EE, Altenau P. (1977). The effects of ephedrine and theophylline on dexamethasone metabolism in bronchial asthma. *J Clin Pharmacol* 17: 308-18.

Brown J. (1980). Effects of alpha adrenoceptor agonists and antagonists and of antidepressant drugs on pre and postsynaptic alpha adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 67: 33-40.

Brunton LL, Blumenthal DK, Murri N, Dandan RH, Knollmann BC. (2006). *Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill-New York (USA), 11ed., p.237-8; 259; 267.

Buckles D. (1995). Velvetbean: a "new" plant with a history. *Econ Bot* 49: 13-25.

Burke J, Seda G, Allen D, Knee TS. (2007). A case of severe exercise-induced rhabdomyolysis associated with a weight-loss dietary supplement. *Military Med* 176: 656-8.

Burkhart KK. (1992). Intravenous propranolol reverses hypertension after sympathomimetic overdose: two case reports. *J Toxicol Clin Toxicol* 30: 109-14.

Canali S. (2001). Doping e culture dopanti in prometeo. *Rivista di Scienza e Storia* 19: 75.

Carpene C, Galitzky J, Fontana E, Atgie C, Lafontan M, Berlan M. (1999). Selective activation of beta3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359: 310-21.

Casson PR, Lindsay MS, Pisarska MD, Carson SA, Buster JE. (2000). Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders: a case series. *Hum Reprod* 15: 2129-32.

Chan TY, Tam HP, Lai CK, Chan AY. (2005). A multidisciplinary approach to the toxicologic problems associated with the use of herbal medicines. *Ther Drug Monit* 27: 53-7.

Chang DM, Lan JL, Lin HY, Luo SF. (2002). Dehydroepiandrosterone treatment of women with mild-to-moderate systemic lupus erythematosus: a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 46: 2924-7.

Chen KK, Schmidt CF. (1930). Ephedrine and related substances. *Medicine monographs*, XVII Williams and Wilkins-Baltimore (USA), p.54-5.

Chen Q, Li P, Zhang Z, Li K, Liu J, Li Q. (2008). Analysis of yohimbine alkaloid from *Pausinystalia yohimbe* by non-aqueous capillary electrophoresis and gas chromatography-mass spectrometry. *J Sep Sci* 31: 2211-8.

Chen WL, Tsai TH, Yang CC, Kuo TB. (2010). Effects of ephedra on autonomic nervous modulation in healthy young adults. *J Ethnopharmacol* 130: 563-8.

Cho S, Hong T, Jin GB, Yoshino G, Miura M, Aikawa Y, Yasuno F, Cyong JC. (2002). The combination therapy of ephedra herb and loxoprofen caused gastric lesions in mice. *Am J Chin Med* 30: 571-7.

Cianchino V, Acosta G, Ortega C, Martínez LD, Gomez MR. (2008). Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. *Food Chem* 108: 1075-81.

Cordaro FG, Lombardo S, Cosentino M. (2011). Selling androgenic anabolic steroids by the pound: identification and analysis of popular websites on the Internet. *Scand J Med Sci Sports* 21: 247-59.

Crosbie D, Black C, McIntyre L, Royle PL, Thomas S. (2007). Dehydroepiandrosterone for systemic lupus erythematosus. *Cochrane Database Syst Rev* 4:3-14.

D'Andrea G, Terrazzino S, Fortin D, Cocco P, Balbi T, Leon A. (2003). Elusive amines and primary headaches: historical background and prospectives. *Neurol Sci* 24: 65-7.

Da Legnano LP. (1973). Le piante medicinali nella cura delle malattie umane. Mediterranee-Roma (IT), 3ed., p.713.

Di Giorgi Gerevini V, Copparoni R, Dalfrà S, Leonardi M, Leonardi M, Guidarelli L. (2005). Ann Ist Super Sanità 41: 55-9.

Direttiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 10 Giugno 2002 concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative agli integratori alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea. L136/85, 12-7-2002.

Direttiva 2004/27/CE del Parlamento e del Consiglio del 31 Marzo 2004 concernente la modifica, per quanto riguarda i medicinali vegetali tradizionali, della direttiva 2001/83/CE recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L136/85, 30-4-2004.

Direttiva 2004/27/EC del Parlamento Europeo e del Consiglio del 10 Giugno 2002 concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative agli integratori alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea. L 136/34. 30-4-2004.

Drew GM. (1976). Effects of alpha adrenoceptor agonists and antagonists on pre- and post synaptically located alpha adrenoceptors. Eur J Pharmacol 36: 313-20.

Drugbank. (2010). Sito supportato da Genome Alberta & Genome Canada and GenomeQuest, Inc. Testosterone enanthate. Disponibile su: <http://www.drugs.com/mtm/testosterone-enanthate.html>. Ultima consultazione 21-6-2012.

Drugbank. (2012). Sito supportato da Genome Alberta & Genome Canada and GenomeQuest, Inc. Nandrolone. Disponibile su: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00984>. Ultima consultazione 21-6-2012.

Drugbank. (2012). Sito supportato da Genome Alberta & Genome Canada and GenomeQuest, Inc. Dehydroepiandrosterone. Disponibile su: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01708>. Ultima consultazione 21-6-2012.

Drugbank. (2012). Sito supportato da Genome Alberta & Genome Canada and GenomeQuest, Inc. Stanozolol. Disponibile su: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB06718>. Ultima consultazione 23-6-2012.

EAFUS - Everything Added to Food in the United States. (2011). Database mantenuto dal U.S. Food e Drug Administration (FDA) Center per Food Safety e Applied Nutrition (CFSAN) nel quadro di un programma in corso conosciuto come il Priority based Assessment of Food Additives. Disponibile su: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=eafusListing>. Ultima consultazione 12-7-2012.

Edwards DJ, Fitzsimmons ME, Schuetz EG, Yasuda K, Ducharme MP, Warbasse LH, Woster PM, Schuetz JD, Watkins P. (1999). 6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. Clin Pharmacol Ther 65: 237-44.

Ernst E. (2002). Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review. J Internal Medicine 252: 107-13.

Evangelisti F, Restani P. (2011). Prodotti dietetici – Chimica, tecnologia ed impiego. Piccin Nuova Libreria S.p.A-Padova, 2ed., p.481-90.

Fair JD. (1993). Isometrics or Steroids? Exploring New Frontiers Of Strength in the Early 1960s. J Sport Hist 20: 1-24.

FDA – Food and Drug Administration. (2001). Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, Disponibile su: (<http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fnl.pdf>). Ultima consultazione 12-7-2012.

FDA – Food and Drug Administration. (2004). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Sales of supplements containing ephedrine alkaloids (Ephedra) prohibited. Disponibile su: <http://www.fda.gov/oc/initiatives/ephedra/february2004>. Ultima consultazione 13-11-2012.

Feuerstein TJ, Hertting G, Jackish R. (1985). Endogenous adrenaline as modulator of hippocampal serotonin release. Dual effect of yohimbine, rauwolscine and corynanthine as α -adrenoceptor antagonists and 5-HT-receptor agonists. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 329: 216-21.

Firenzuoli F, Gori L, Galapai C. (2005). Adverse reaction to an adrenergic herbal extract (*Citrus aurantium*). Phytomedicine 12: 247-8.

Fleming T. (1998). PDR for Herbal Medicines, Medical Economics company, Montvale, NJ.

Fraunfelder FW. (2004). Ocular side effects from herbal medicines and nutritional supplements. Am J Ophthalmol 138: 639-47.

Fugh-Berman A, Myers A. (2004). *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. Exp Biol Med 229: 698-704.

Fugh-Berman A. (2000). Herb-drug interactions. Lancet 355: 134-8.

Gange CA, Madias C, Felix-Getzik EM, Weintraub AR, Estes NAM. (2006). Variant angina associated with bitter orange in a dietary supplement. Mayo Clin Proc 81: 545-8.

Geyer H, Parr MK, Mareck U, Reinhart U, Schrader Y, Schanzer W. (2004). Analysis of non-hormonal nutritional supplements for anabolic-androgenic steroids results of an international study. Inter J Spor Med 25:124-9.

Giampreti A, Lonati D, Locatelli C, Rocchi L, Campailla MT. (2009). Acute neurotoxicity after yohimbine ingestion by a body builder. Clin Toxicol (Phila) 47: 827-9.

Golberg MR, Robertson D. (1983). Yohimbine: a pharmacological probe for study of the alpha-2-adrenoreceptor. Pharmacol Rev 35: 143-80.

Gray S, Woolf AD. (2005). *Citrus aurantium* used for weight loss by an adolescent with anorexia nervosa. J Adolesc Health 37: 415-6.

Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Carrier J, Khan IA, Edwards DJ, Shah A. (2004). In vivo assessment of botanical supplementation on human cytochrome P450 phenotypes: *Citrus aurantium*, *Echinacea purpurea*, milk thistle, and saw palmetto. Clin. Pharmacol and Ther 76: 428-40.

Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA. (2000). Content versus label claims in *Ephedra* containing dietary supplements. Am J Health Syst Pharm 57: 963-9.

Gurley BJ, Gardner SF, White LM, Wang PL. (1998). Ephedrine pharmacokinetics after the ingestion of nutritional supplements containing *Ephedra sinica* (ma huang). Ther Drug Monit 20: 439-45.

Haller CA, Benowitz NL, Jacob III P. (2005). Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss supplements in humans. Am J Med 9: 998-1003.

Haller CA, Benowitz NL. (2000). Adverse cardiovascular and central nervous system events associated with dietary supplements containing *ephedra* alkaloids. N Engl J Med 343: 1833-8.

Haller CA, Jacob III P, Benowitz NL. (2002). Pharmacology of *ephedra* alkaloids and caffeine after single-dose dietary supplement use. Clin Pharmacol Ther 71: 421-32.

Hart B. (2005). The evolution of herbal medicine: behavioural perspectives. Anim Behav 70: 975-89.

Higdon JV, Frei B. (2006). Coffee and health: a review of recent human research. Crit Rev Food Sci Nutr 46: 101-23.

Hoffman BB, Taylor P. (2001). Neurotransmission. In: Brunton LL, Blumenthal DK, Murri N, Dandan RH, Knollmann BC. (2006). Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill-New York (USA), 11ed., p.115-53.

Holmes RO Jr, Tavee J. (2008). Vasospasm and stroke attributable to ephedra-free Xenadrine: case report. Military Med 173: 708-10.

Houlihan B. (1999). Dying to Win: Doping in Sport and the Development of an Anti-Doping Policy. Strasbourg: Council of Europe, p. 70. In O'Leary J. (2001). Drugs and doping in sport: Socio-Legal Perspectives. Cavendish Publishing Limited-London (UK), p.94.

Jacobs I, Pasternak H, Bell DG. (2003). Effects of ephedrine, caffeine, and their combination on muscular endurance. Med Sci Sports Exerc 35: 987-94.

Jickells S, Negrusz A. (2008). Clarke's Analytical Forensic Toxicology. Pharmaceutical Press Chicago-USA, p. 52

Johns T. (1990). With bitter herbs they shall eat it: chemical ecology and the origins of human diet and medicine. J Hist Beh Sc 390-2.

Katzung B. (2001). Basic & Clinical Pharmacology. McGraw-Hill-New York (USA), 8ed., p.121.

Kicman AT, Bassindale T, Cowan DA, Dale S, Hutt AJ, Leeds AR. (2003). The effect of androstenedione ingestion on plasma testosterone in young women; a dietary supplement with potential health risks. Clin Chem 49, 167-9.

Labrie F. (2004). Adrenal androgens and intracrinology. Semin Reprod Med 22: 299-309.

Lacomblez L, Bensimon G, Isnard F. (1989). Effect of yohimbine on blood pressure in patients with depression and orthostatic hypotension induced by clomipramine. Clin Pharmacol Ther 45: 241-51.

Landis E, Shore E. (1989). Yohimbine-induced bronchospasm. Chest 96: 1424.

Langer SZ. (1980). Presynaptic regulation of the release of catecholamines. Pharmacol Rev 32: 337-62.

Lee MK, Cheng BW, Che CT, Hsieh DP. (2000). Cytotoxicity assessment of Ma-huang (*Ephedra*) under different conditions of preparation. Toxicol Sci 56: 424-30.

Williams LT, Lefkowitz RJ. (1976). Thyroid Hormone Regulation of p-Adrenergic Receptor Number. J Biol Chem 252: 2787-9.

Malhotra S, Bailey DG, Paine MF, Watkins PB. (2001). Seville orange juice-felodipine interaction: comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. Clin Pharmacol Ther 69: 14-23.

Mandel HG. (2002). Update on caffeine consumption, disposition and action. Food Chem Toxicol 40: 1231-4.

Manduchi I. (1995). Caleidoscopio Italiano. Medical Systems S.p.A.-Genova, p. 28.

Marles R. (2011). Synephrine, Octopamine and Caffeine health risk assessment (HRA) report. Health Canada Natural Health Products Directorate. File Number 172091.

Martindale. (1999). The Complete Drug Reference. In: Parfitt K. The Pharmaceutical Press-London (UK), 32ed., p.1398.

Matthew W. Feltenstein, Ronald E. (2006). Potentiation of cue-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats by the anxiogenic drug yohimbine. Beh Brain Res 174: 1-8.

Minghetti P, Marchetti M. (2010). Legislazione farmaceutica. Esami di farmacia. Casa Editrice Ambrosiana-Milano (IT), 6ed., p.336-37; 589.

Ministero della salute. (2012). Estratti vegetali ammessi negli integratori alimentari. Disponibile su: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1268_listaFile_itemName_2_file.pdf. Ultimo accesso 14-11-2012.

Ministero della salute. (2009). Estratti vegetali non ammessi negli integratori alimentari. Disponibile su: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1268_listaFile_itemName_3_file.pdf. Ultimo accesso 22-06-2012.

Ministero della Salute. (2002). Circolare n.3 del 18 luglio 2002 - Applicazione della procedura di notifica di etichetta di cui all'art. 7 del decreto legislativo n. 111/1992, ai prodotti a base di piante e derivati aventi finalita' salutistiche. In: Gazzetta Ufficiale n.188 del 12 Agosto 2002. Disponibile su: <http://gazzette.comune.jesi.an.it/2002/188/9.htm>. Ultimo accesso 14-11-2012.

Morales A. (2000). Yohimbine in erectile dysfunction: the facts. Department of Urology, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada. Int J Impot Res 1: 70-4.

Mort JR, Kruse HR. (2008). Timing of blood pressure measurement related to caffeine consumption. Ann Pharmacother 42: 105-10.

Murburg MM, Villacres EC, Ko GN, Veith RC. (1991). Effects of yohimbine on human sympathetic nervous system function. J Clin Endocrinol Metab 73: 861-5.

Musso NR, Vergassao C, Pjende A. (1995). Yohimbine effects on blood pressure and plasma catecholamines in human hypertension. Am J Hypertens 8: 565-71.

Mustafa SM, Bavadekar SA, Ma G, Moore BM, Feller DR, Miller DD. (2005). Synthesis and biological studies of yohimbine derivatives on human α_2 -adrenergic receptors. Bioorg Med Chem Lett 15: 2758-60.

Nasir JM, Durning SJ, Ferguson M, Barold HS, Haigney MC. (2004). Exercise-induced syncope associated with QT prolongation and ephedra-free Xenadrine. Mayo Clin Proc 79: 1059-62.

Nishikawa T, Kimura T, Taguchi N, Dohi S. (1991). Oral clonidine preanesthetic medication augments the pressor responses to intravenous ephedrine in awake or anesthetized patients. Anesthesiology 74: 705-10.

Nykamp DL, Fackih MN, Compton AL. (2004). Possible association of acute lateral-wall myocardial infarction and bitter orange supplement. Ann Pharm 38: 812-6.

O'Leary J. (2001). Drugs and doping in sport: Socio-Legal Perspectives. Cavendish Publishing Limited- London (UK), p.263

Parmar HS, Kar A. (2008). Medicinal values of fruit peels from *Citrus sisensis*, *Punica granatum*, and *Musa paradisiacal* with respect to alterations in tissue lipid peroxidation and serum concentration of glucose, insulin, and thyroid hormones. *J Med Food* 2: 376-81.

Pentel P. (1984). Toxicity of over-the-counter stimulants. *JAMA* 252: 1898-903.

Penzak SR, Jann MW, Cold JA, Hon YY, Desai HD, Gurley BJ. (2001). Seville (sour) orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults. *J Clin Pharmacol* 41: 1059-63.

Perry LM, Metzger J. (1980). Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses. MIT press-Cambridge, p.389.

Pichini S, Marchei E, Palmi I, Pellegrini M, Pacifici R, Zuccaro P. (2010). Smart Drugs. Istituto Superiore di Sanità-Roma, 2ed., p.61-8.

Preuss HG, DiFernando D, Bagchi M, Bagchi D. (2002). *Citrus aurantium* as a thermogenic, weight reduction replacement for *ephedra*: an overview. *J Medicine* 33: 247-64.

Price LH, Charney DS, Heninger GR. (1984). Three cases of manic symptoms following yohimbine administration. *Am J Psychiatry* 141: 1267-8.

Putzbach K, Rimmer CA, Sharpless KE, Sander LC. (2007). *J Chromatogr A* 1156: 304-11.

Rang HP, Ritter JM, Dale MM, Moore PK. (2004). *Farmacologia*. Elsevier-Oxford, 5ed.

Regolamento (CE) no 178/2002 del parlamento Europeo e del Concilio del 28 Gennaio 2002 che stabilisce i principi ei requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce egli Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*. L31/1. 01-02-2002.

Reid DP. (1987). *Chinese Herbal Medicine*. CFW Publications-Hong Kong, p.111.

Reiter WJ, Pycha A, Schatzl G, Pokorny A, Gruber DM, Huber JC, Marberger M. (1999). Dehydroepiandrosterone in the treatment of erectile dysfunction: a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Urology* 53: 590-4; discussion 594-5.

Retamero C, Rivera T, Murphy K. (2011). "Ephedra-free" diet pill-induced psychosis. *Psychosomatics* 52: 579-82.

Riley AJF. (1994). Yohimbine in the treatment of erectile disorder. *Br J Clin Pract Suppl* 48:133-6.

- Ritsner MS. (2011). The clinical and therapeutic potentials of dehydroepiandrosterone and pregnenolone in schizophrenia. *Neuroscience* 191: 91-100.
- Roeder T. (1999). Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol* 59: 533-61
- Roman MC, D Gray, Luo G, McClanahan R, Perez R, Roper C, Roscoe V, Shevchuk C, Suen E, Sullivan D, Walther HJ. (2004). Determination of Ephedrine Alkaloids in Botanicals and Dietary Supplements by HPLC-UV. *J AOAC* 87: 1-14.
- Ryan CK, Reamy B, Rochester JA. (2002). Ischemic colitis associated with herbal product use in a young woman. *J Am Board Fam Pract* 15: 309-12.
- Sandler B, Aronson P. (1993). Yohimbine-induced cutaneous drug eruption, progressive renal failure, and lupus-like syndrome. *Urology* 41: 343-5.
- Santo Ferrara D. (2004). Doping antidoping. Piccin-Padova, p.5-10.
- Sever PS, Dring LG, Williams RT. (1975). The metabolism of (-)-ephedrine in man. *Eur J Clin Pharmacol* 9: 193-8.
- Shekelle PG, Hardy ML, Morton SC, Maglione M, Mojica WA, Suttorp MJ, Rhodes SL, Jungvig L, Gagne J. (2003). Efficacy and safety of *ephedra* and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. *JAMA* 289: 1537-45.
- Shepard JD, Bossert JM, Liu SY, Shaham Y. (2004). The Anxiogenic Drug Yohimbine Reinstates Methamphetamine Seeking in a Rat Model of Drug Relapse. *Biol Psychiatry* 55: 1082–9.
- Spraul M, Ravussin M, Fontvieille, AM, Rising R, Larson DE, Anderson EA. (1993). Reduced sympathetic nervous activity: a potential mechanism to body weight gain. *J Clin Invest* 92: 1730-5.
- Stephensen TA, Sarlay R. (2009). Ventricular fibrillation associated with the use of synephrine containing dietary supplement. *Military Med* 174: 1313-9.
- Stohs SJ, Preuss HG, Shara M. (2011). A review of the receptor-binding properties of p-synephrine as related to its pharmacological effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2011; 2011: 482973.
- Stohs SJ. (2010). Assessment of the adverse event reports associated with *Citrus aurantium* (bitter orange) from April 2004 to October 2009. *J Functional Foods* 2: 235-8.

Sultan S, Spector J, Mitchell RM. (2006). Ischemic colitis associated with use of a bitter orange-containing dietary weight-loss supplement. *Mayo Clin Proc* 81: 1630-1.

Sunderland T, Tchoundjeu Z. (2000). The exploitation of *Pausinystalia yohimbe*. *Med Plant Cons* 6: 21-2.

Suzuki O, Matsumoto T, Oya M, Katsumata Y. (1979). Oxidation of synephrine by type A and type B monoamine oxidase. *Experientia* 35: 1283-4.

Sweetman SC. (2007). *Martindale: The Complete Drug Reference*. Pharmaceutical Press-London (UK), 33ed., p.953.

Thomas JE, Munir JA, McIntyre PZ, Ferguson MA. (2009). STEMI in a 24-year-old man after use of a synephrine-containing dietary supplement. *Texas Heart Inst J* 36: 586-90.

Tyler VE. (1994). *Herbs of Choice: The Therapeutic use of phytochemicals*. Pharmaceutical Products Press, New York. Pharmaceutical Products Press 182-4.

Vaysse J, Balayssac S, Gilard V, Desoubdizanne D, Malet-Martino M, Martino R. (2010). Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY 1H-NMR. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 27: 903-16.

Vigorita A. (1971). Il doping degli atleti nel diritto ordinario e in quello sportivo. *Rivista di Diritto Sportivo*, p.275.

Vitalone A, Menniti-Ippolito F, Moro PA, Firenzuoli F, Raschetti R, Mazzanti G. (2011). Suspected adverse reactions associated with herbal products used for weight loss: a case series reported to the Italian National Institute of Health. *Eur J Clin Pharmacol* 67: 215-24.

WADA - World Anti-Doping Agency. (2012). Documento tecnico attuativo del Codice Mondiale Antidoping e dei relativi Standard internazionali. Disponibile su: http://it.uefa.com/MultimediaFiles/Download/EuroExperience/uefaorg/Antidoping/78/82/89/788289_DOWNLOAD.pdf. Ultima consultazione 23-6-2012.

White LM, Gardner SF, Gurley BJ, Marx MA, Wang PL, Estes M. (1997). Pharmacokinetics and cardiovascular effects of ma-huang (*Ephedra sinica*) in normotensive adults. *J Clin Pharmacol* 37: 116-22.

WHO - World Health Organization. (2012). WHO Pharmacovigilance Guidelines. Disponibile su: <http://www.who-umc.org/Graphics/26649.pdf>. Ultima consultazione 30-11-2012.

Yakoot M. (2012). Phenylpropanolamine and the hemorrhagic stroke: A new search for the culprit. *J Pharmacol Pharmacother* 3: 4-6.

Yang YT, McElligott MA. (1989). Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *J Biochem* 261: 1-10.

Zahn KA, Li RL, Purssell RA. (1999). Cardiovascular toxicity after ingestion of "herbal ecstasy." *J Emerg Med* 17: 289-91.